

Aus der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

**Einfluss von funktionell effektiven Genpolymorphismen auf den  
Chromosomen 9 und 16 auf die Manifestation der chronischen  
Parodontitis**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnmedizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Verena Buhl

aus  
Starnberg

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Matthias Folwaczny

Mitberichterstatter: PD Dr. Tim M. Strom

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 22.10.2019

## **Eidesstattliche Versicherung**

Buhl, Verena

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

### **Einfluss von funktionell effektiven Genpolymorphismen auf den Chromosomen 9 und 16 auf die Manifestation der chronischen Parodontitis**

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Germering, 04.11.2019

Ort, Datum

Verena Buhl

Unterschrift Doktorand/in

*Meinen Eltern*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Chronische Parodontitis .....</b>	<b>2</b>
2.1	Klassifikation und Epidemiologie .....	2
2.2	Ätiopathogenese der Parodontitis.....	3
2.3	Risikofaktoren der Parodontitis.....	4
2.3.1	Rolle der parodontalpathogenen Mikroorganismen.....	5
2.3.2	Einflüsse exogener Faktoren .....	6
2.3.3	Reaktionen des Immunsystems .....	8
2.4	Genetischer Hintergrund .....	11
2.4.1	Formen von Polymorphismen .....	12
2.4.1.1	Einzelnukeotid-Polymorphismen .....	12
2.4.1.2	Mikro/Minisatellitenpolymorphismen und Kopienzahlvariationen ..	12
2.4.2	Vererbung der Parodontitis .....	13
2.4.3	Assoziationsstudien als Methode der genetischen Analyse der chronischen Parodontitis.....	14
2.5	Die untersuchten Polymorphismen.....	16
2.5.1	Chromosom 9 .....	18
2.5.1.1	Polymorphismus rs4986790.....	18
2.5.1.2	Polymorphismus rs4263839.....	21
2.5.1.3	Polymorphismus rs10758669.....	23
2.5.2	Chromosom 16.....	27
2.5.2.1	Polymorphismus rs2066845 und .....	27
2.5.2.2	Polymorphismus rs2066844.....	27
<b>3</b>	<b>Ziele der Studie .....</b>	<b>30</b>
<b>4</b>	<b>Material und Methode.....</b>	<b>31</b>
4.1	Studienpopulation.....	31
4.1.1	Klinische Untersuchungen.....	31
4.1.2	Patientengruppe mit Parodontitis .....	32
4.2	Beschreibung der Methoden und des verwendeten Materials.....	32
4.2.1	Blutentnahme.....	32
4.2.2	Aufbereitung und Lagerung der Blutproben .....	33
4.2.3	DNA-Isolierung.....	33
4.2.3.1	Verwendung des QIAamp® Blood MidiKit (Qiagen) .....	33
4.2.3.2	Verwendung der Aussalzmethode.....	34
4.2.4	Bestimmung der Nukleinsäurenkonzentration.....	35
4.2.5	Genotypisierung via MALDI-TOF (matrix assisted laser desorption/ionisation time of flight mass spectrometry) .....	35
4.3	Statistische Auswertung .....	37
4.3.1	Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.....	37
4.3.2	Chi-Quadrat-Test (Mehrfelder-Test).....	38
4.3.3	Fisher's-Exact Test (Vier-Felder-Test) .....	38
4.3.4	Quotenverhältnis (OR).....	39
4.3.5	Bonferroni-Korrektur für multiples Testen .....	39
4.3.6	AIC-Wert.....	39
4.3.7	Multinominale logistische Regression.....	40
4.3.8	Kopplungsungleichgewichte und Haplotypanalyse .....	40

4.3.9. Schätzung von Haplotypen.....	41
<b>5 Ergebnisse.....</b>	<b>42</b>
5.1 Charakteristika der Studienpopulation .....	42
5.2 Hardy-Weinberg-Gleichgewicht .....	43
5.2.1 Polymorphismen auf Chromosom 9.....	43
5.2.1.1 Polymorphismus rs4986790.....	43
5.2.1.2 Polymorphismus rs 4263839.....	43
5.2.1.3 Polymorphismus rs10758669.....	44
5.2.2 Polymorphismen auf Chromosom 16.....	44
5.2.2.1 Polymorphismus rs2066845.....	44
5.2.2.2 Polymorphismus rs2066844.....	44
5.3 Untersuchte Polymorphismen in der Studienpopulation .....	45
5.3.1 Chromosom 9 .....	45
5.3.1.1 Polymorphismus rs4986790.....	45
5.3.1.2 Polymorphismus rs4263839.....	47
5.3.1.3 Polymorphismus rs10758669.....	49
5.3.2 Chromosom 16.....	50
5.3.2.1 Polymorphismus rs2066845.....	50
5.3.2.2 Polymorphismus rs2066844.....	53
5.4 Allel- und Genotypverteilung in Abhängigkeit vom Geschlecht.....	54
5.4.1 Vergleich mit den untersuchten Polymorphismen auf Chromosom 9.....	54
5.4.1.1 Polymorphismus rs4986790.....	54
5.4.1.2 Polymorphismus rs4263839.....	56
5.4.1.3 Polymorphismus rs10758669.....	58
5.4.2 Vergleich mit den untersuchten Polymorphismen auf Chromosom 16.....	59
5.4.2.1 Polymorphismus rs2066845.....	59
5.4.2.2 Polymorphismus rs2066844.....	62
5.5 Allel- und Genotypfrequenz in Abhängigkeit vom Nikotinabusus.....	63
5.5.1 Vergleich mit den untersuchten Polymorphismen auf Chromosom 9.....	63
5.5.1.1 Polymorphismus rs4986790.....	63
5.5.1.2 Polymorphismus rs4263839.....	65
5.5.1.3. Polymorphismus rs10758669.....	67
5.5.2 Vergleich mit den untersuchten Polymorphismen auf Chromosom 16.....	68
5.5.2.1 Polymorphismus rs2066845.....	68
5.5.2.2 Polymorphismus rs2066844.....	70
5.6 Multinominale logistische Regression.....	73
5.7 Kopplungsanalyse in der Studienpopulation .....	74
5.8 Haplotypenanalyse.....	75
5.8.1 Schätzung der Haploypen auf Chromosom 9 und Chromosom 16 .....	75
5.8.2 Assoziation der Haplotpyen auf Chromosom 9 mit der chronischen Parodontitis.....	76
5.8.3 Assoziation der Haplotypen auf Chromosom 16 mit der chronischen Parodontitis.....	78
<b>6 Diskussion.....</b>	<b>79</b>
6.1 Bewertung von Assoziationsstudien als Methode zur Analyse der genetischen Komponente der chronischen Parodontitis.....	79
6.2 Studienpopulation .....	82
6.3 Studiendesign und Methodik .....	85

6.3.1	Auswahl der Kandidatengene .....	85
6.3.2	Validität der Genotypisierung via Maldi-TOF.....	85
<b>6.4</b>	<b>Vergleich der Frequenzen der Kontrollgruppe mit Kohorten der Literatur .....</b>	<b>87</b>
<b>6.5</b>	<b>Interpretation der Ergebnisse bezüglich möglicher Auswirkungen auf die chronische Parodontitis.....</b>	<b>90</b>
6.5.1	Funktionelle Wirkung des Polymorphismus rs4986790 (Chromosom 9).....	90
6.5.2	Funktionelle Wirkung des Polymorphismus rs4263839 (Chromosom 9).....	92
6.5.3	Funktionelle Wirkung des Polymorphismus rs10758669 (Chromosom 9).....	94
6.5.4	Funktionelle Wirkung der Polymorphismen rs2066844 und rs2066845 (Chromosom 16).....	96
6.5.5	Interpretation der Haplotypenanalyse .....	99
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>101</b>
<b>8</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>102</b>
8.1	Abkürzungsverzeichnis .....	102
8.2	Tabellenverzeichnis.....	105
8.3	Abbildungsverzeichnis.....	109
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>111</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>144</b>
<b>11</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>145</b>

# 1 Einleitung

Die chronische Parodontitis ist eine Erkrankung des Zahnhalteapparates mit komplexer Ätiopathogenese, verursacht durch bakterielle Plaque. Ihre klinische Manifestation hängt sowohl von Umwelteinflüssen, als auch von der genetischen Prädisposition des betroffenen Individuums ab (Kornman 2008). Insbesondere Polymorphismen der Gene der Immunabwehr können das Risiko erhöhen, eine Parodontitis zu entwickeln (Yoshi et al. 2007), denn nicht jeder Mensch ist gleich anfällig dafür, an Parodontitis zu erkranken (Kornman 2001). Es gibt verschiedene Methoden der Genanalyse, wie beispielsweise Familienstudien (Chung et al. 1977) und Zwillingsstudien, durch die Michalowicz et al. (1991) und Corey et al. (1993) die Einflüsse genetischer Faktoren auf die Entstehung der Parodontitis nachwiesen. Auch in Zusammenhang mit anderen chronisch entzündlichen Erkrankungen, wie *Morbus Crohn* (Barrett et al. 2008) und *Colitis ulcerosa* (The UK IBD Consortium et al. 2009) konnte, durch genetische Assoziationsstudien, der Einfluss bestimmter Polymorphismen auf die Erkrankung beobachtet werden. Von Wechselwirkungen zwischen der chronischen Parodontitis und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wurde bereits 1991 von Flemmig et al. sowie 2017 von Papageorgiou et al. berichtet. Demnach ist es plausibel, Kandidatengene, die nachweislich ursächlich für Erkrankungen mit ähnlichem ätiologischen Hintergrund wie die chronische Parodontitis sind, auch hinsichtlich ihrer Auswirkung auf diese zu erforschen, um weitere Erkenntnisse über die Pathogenese dieser komplexen Erkrankung zu gewinnen. In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob fünf Polymorphismen, die bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eine Rolle spielen (Barrett et al. 2008, Anderson et al. 2011, Juyal et al. 2011, Browning et al. 2007, McGovern et al. 2010), gegebenenfalls auch in ätiologischem Zusammenhang mit der chronischen Parodontitis in einer mitteleuropäischen, kaukasischen Population stehen. Die Möglichkeit, ein genetisches Risikoprofil eines Patienten unter Berücksichtigung der Umweltfaktoren zu bestimmen, könnte die Effektivität der Therapiemöglichkeiten steigern (Schenkein 2002).



## 2 Chronische Parodontitis

### 2.1 Klassifikation und Epidemiologie

Das gesunde marginale Parodontium der kaukasischen Bevölkerung wird als blass rosa und gestipelt beschrieben. Es liegt den darunterliegenden Geweben straff an, verläuft girlandenförmig, und blutet nicht auf Sondierung (Lindhe et al. 2003). 48,4 % der Erwachsenen zwischen 35-44 weisen ein gesundes Parodontium auf, 43,4% leiden an einer moderaten Parodontitis und 8,2% an einer schweren Parodontitis, wie die fünfte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS V) von 2016 zeigt. Menschen im Alter von 65-74 Jahren sind zu 44,8% mittelschwer (3-4 mm Attachmentverlust) und zu 19,8 % schwer (>5 mm Attachmentverlust) an Parodontitis erkrankt (Müller 2001). Noch Mitte der 1960er Jahre wurde angenommen, dass alle Individuen mehr oder weniger gleich anfällig für die marginale Parodontitis sind, dass sich Gingivitis zu Parodontitis entwickelt und zu Knochenabbau führe und dass die marginale Parodontitis der Hauptgrund für Zahnverlust ab einem Alter von 35 Jahren ist (Academy Report 2005). In den 1980er und 1990er Jahren wurde bekannt, dass sich nicht jede Gingivitis zur Parodontitis entwickelt, die aggressive Form der Parodontitis eher selten ist, jedoch bei fast jedem Erwachsenen vereinzelte Verluste an parodontalem Attachment anzutreffen sind.

Durch Klassifizierungssysteme einer Erkrankung kann der Kliniker den individuellen Behandlungsbedarf eines Patienten besser einschätzen (Müller 2001). Klassifikationen wurden erst im 19. Jahrhundert, als noch wenig über die Ätiologie und Pathogenese der Parodontitis bekannt war, durch klinische Charakteristika erstellt. In den Jahren 1920-1970 klassifizierte man die Parodontitis anhand der Konzepte der klassischen Pathologie und von 1970 bis heute mit Hilfe der infektiösen Ätiologie der Erkrankungen (Armitage 2002). Das heute allgemein akzeptierte System zur Einteilung der Parodontalerkrankungen ist die 1999 von der *American Academy of Periodontology* und von der EFP (European Federation of Periodontology) entwickelte Klassifikation (Armitage 1999). Unterschieden wird hier zwischen Erkrankungen der Gingiva, chronischer Parodontitis, aggressiver Parodontitis, Parodontitis als Manifestation von Infektionskrankheiten, nekrotisierenden Formen der Parodontitis, Parodontalabszessen, Paro-Endo-Läsionen und entwicklungsbedingten oder erworbenen Deformitäten und Zuständen.

Die chronische Parodontitis tritt am häufigsten im Erwachsenenalter auf, ist jedoch auch bei Jugendlichen und Kindern zu beobachten. Sie kann generalisiert vorkommen, wobei mehr als 30% der Zahnflächen betroffen sind. Als lokalisiert wird die chronische Parodontitis bezeichnet, wenn weniger als 30% der Zahnflächen von der Krankheit betroffen sind. 1999 listete der *International Workshop for a Classification of Periodontal Disease and Conditions* weitere Merkmale der chronischen Parodontitis auf, wie z.B. das Vorhandensein subgingivaler Konkreme, den Zusammenhang mit Umwelteinflüssen, wie z.B. Rauchen und das langsame bzw. moderate Voranschreiten der Erkrankung, wobei Phasen des raschen Verlaufs nicht ausgeschlossen sind (Lindhe et al. 1999).

## **2.2 Ätiopathogenese der Parodontitis**

Auf die Ätiologie entzündlicher Erkrankungen des Zahnhalteapparates nehmen sowohl primäre als auch sekundäre Faktoren Einfluss. Die im Biofilm vorhandenen Pathogene und die daraus resultierende entzündliche Reaktion des Parodonts sind Hauptursache für die Entstehung und den Verlauf der Parodontalerkrankung. Sekundäre Faktoren sind z. B. offene kariöse Läsionen, mangelhaft konturierte Kronen- und Füllungsrande, Putztraumata, endogene und systemische Störungen, hormonelle und medikamentös bedingte Erkrankungen, Ernährungsverhalten und kaufunktionelle Probleme. Diese beeinflussen den Verlauf der Erkrankung (Hellwig et al. 2006, Lehmann et al. 2002). Die marginale Parodontitis ist eine Infektionskrankheit, für deren Entstehung das Vorhandensein von Mikroorganismen essentiell ist. Genauso wichtig für das Auftreten und den Schweregrad der Erkrankung sind Wirtsfaktoren, wie die genetische Prädisposition eines Individuums und Umweltfaktoren (Page et al. 1997), denn allein das Auftreten parodontalpathogener Keime führt nicht bei jedem Menschen zwangsläufig zu einer Parodontalerkrankung (Hellwig 2006).

Die Entwicklung der Gingivitis und der Parodontitis teilten Page und Schroeder 1976 in mehrere Stadien ein. Die initiale Läsion tritt während der ersten 4 Tage nach der Plaquebildung, resultierend aus mangelhafter Mundhygiene auf. Sie ist gekennzeichnet durch Ödembildung, erhöhtes Flüssigkeitsexsudat im gingivalen Sulkus, einer Ansammlung von polymorphkernigen Leukozyten und Auflockerung des Saume epithels. Dies ist klinisch nicht erkennbar. Nach 4-7 Tagen entwickelt sich die frühe Läsion. Die Zahl der Lymphozyten und Makrophagen nimmt zu, ein perivaskuläres Infiltrat tritt auf und Kollagenfasern degenerieren, was jedoch vorerst nicht zu Attachmentverlust führt.

Dieses Stadium ist noch vollständig reversibel. Bei manchen Menschen verändert sich die frühe Läsion, sei es durch Umweltfaktoren, durch angeborene Anfälligkeit oder durch beides zu einer B-Zellen/Plasma-Zellen dominierten Immunantwort, mit hohem Interleukin-1 und Interleukin-6 Spiegel sowie fortschreitendem Kollagenverlust. Das Saumepithel proliferiert nach apikal, was zur Taschenbildung führt (Ohlrich et al. 2009). Dieses Stadium kann über Jahre stabil bleiben. Dehnt sich die entzündliche und immunologische Gewebereaktion auf den Alveolarknochen aus, spricht man von der fortgeschrittenen Läsion (Page&Schroeder et al. 1976). Parodontalpathogene Mikroorganismen können durch ihre Virulenzfaktoren die Immunabwehr zusätzlich beeinflussen und somit zu Gewebeerstörung und letztendlich zum Zahnverlust führen. Da jedoch nur eine begrenzte Anzahl an Individuen, die von diesen Pathogenen befallen sind, auch Knochenabbau aufweisen, wird von einer komplexeren Ätiologie in Form eines Ungleichgewichtes zwischen Wirt und Parasiten ausgegangen (Kinane et al. 2007). Heute ist allgemein anerkannt, dass eine Vielzahl von Zytokinen, zellmodulierende Moleküle, die von ortständigen und eingewanderten Zellen ausgeschüttet werden, die Pathogenese der Parodontitis beeinflussen. Weiterhin können Matrixmetalloproteinasen (MMPs) beispielsweise durch Zytokine, wie Interleukin 17, falsch reguliert sein. Dies könnte im Zusammenhang mit der chronischen Parodontitis zur Gewebeerstörung beitragen. Matrixmetalloproteinasen sind eine Gruppe von Enzymen, die in den Abbau von extrazellulären Matrixmolekülen involviert sind. Sie spalten Peptidbindungen in Proteinen und spielen eine Rolle beim Gewebeumbau, beispielsweise im Zuge der Wundheilung. Zusammen sind diese Entzündungsmediatoren in der Lage, eine Reihe von molekularen Vorgängen auszulösen, die mit der Zerstörung von extrazellulärer Matrix assoziiert sind und zum Gewebeuntergang führen (Bartold et al. 2010, Rose et al. 2016, Wu et al. 2013).

### **2.3 Risikofaktoren der Parodontitis**

Die Erkenntnis, dass die marginale Parodontitis eine komplexe Erkrankung mit multifaktorieller Ätiologie ist, veranlasste die Suche nach Risikofaktoren, die für die Prädisposition für die marginale Parodontitis verantwortlich sind, sowie zu verschiedenen klinischen Ausprägungsformen dieser Erkrankungen führen (Stabholz et al. 2010).

### 2.3.1 Rolle der parodontalpathogenen Mikroorganismen

In einer parodontalen Tasche kommen mehr als 700 verschiedene bakterielle Spezies vor (Sharma 2010). Es können sowohl nicht pathogene Erreger, als auch fakultativ pathogene Keime gefunden werden, welche sich normalerweise im stabilen Gleichgewicht befinden. Durch mangelhafte Mundhygiene, durch das Eindringen neuer Mikroorganismen oder durch Veränderung der mikrobiologischen Lebensbedingungen kommt es zu einem Ungleichgewicht und folglich zur Begünstigung der Proliferation pathogener Keime.

Unmittelbar nach Reinigung der Zähne entsteht ein Film aus Proteinen und Glykoproteinen, an den sich bestimmte Bakterien anheften können, woraufhin sich weitere Bakterien durch spezifische Molekülinteraaktionen ansammeln und sich ein Biofilm bildet (Marsh et al. 1995). Die entzündliche Erkrankung der marginalen Parodontitis wird folglich durch einen bakteriellen Biofilm induziert, der sich am Rand der Gingiva ansammelt, wobei die verschiedenen Bakterienspezies unterschiedliche Pathogenität aufweisen (Haffajee et al. 1994). Eine Reihe von abnormen entzündlichen Reaktionen werden im parodontalen Gewebe vor allem durch gram-negative Bakterien, wie *Porphyromonas gingivalis* (P.g), *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (A.a), *Tannerella forsythensis* (T.f) und *Treponema denticola* (T.d) hervorgerufen (Feng et al. 2006). Parodontalpathogen sind diese Mikroorganismen durch ihre Fähigkeit, sich subgingival anzusiedeln, eine gewebezerstörende Immunabwehr zu triggern sowie Proteasen und Exotoxine freisetzen zu können. Sie sind teilweise in der Lage Gewebeverbindungen aufzulösen und somit invasiv in tiefere Schichten vorzudringen (Nishihara et al. 2004, Kochi et al. 2017).

*Actinobacillus actinomycetemcomitans* ist ein fakultativ anaerober, nicht beweglicher, gram negativer Keim, der unter anderem zwei Toxine freisetzt: ein RTX (*repeat in toxin*) Leukotoxin und ein CDT (*cytolethal distending toxin*). Beides sind starke Toxine, die in der Lage sind, Zellen der Immunabwehr zu zerstören. Es gibt verschiedene Subtypen dieses Keimes, wobei es möglich ist, dass nicht alle gleich stark pathogen sind. Die bisherige Forschung lässt vermuten, dass die Anwesenheit bzw. Abwesenheit dieses Keimes nicht der einzige Indikator für ein Erkrankungsrisiko ist, sondern auch die Kombination mit anderen Keimen die Schwere der Parodontalerkrankung bestimmen könnte (Henderson et al. 2010). Bakterien ist es möglich, sich in der subgingivalen Plaque zu Komplexen zu organisieren. P.g, T.d, und T.f. können den sogenannten Roten Komplex bilden und sind zusammen parodontalpathogener als

andere bekannte Bakterien der dentalen Plaque. Dieser Komplex konnte mit klinischen Anzeichen einer Parodontitis wie erhöhte Taschensondierungstiefe und Blutung auf Sondierung in Verbindung gebracht werden (Socransky et al. 1998). Bezogen auf *T. forsythia* werden wahrscheinlich dessen Virulenzgene nur dann exprimiert, wenn das Bakterium in direkten Kontakt zu anderen Mikroorganismen des roten Komplexes, oder mit dem Wirt kommt (Sharma et al. 2010). *T. denticola* hat neben seinen virulenten Eigenschaften, wie die Induktion und die Degradation von Zytokinen, weitere einzigartige Mechanismen. Es ist beispielsweise in der Lage die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten und Fibroblasten zu unterdrücken (Ishihara et al. 2010). *P. gingivalis* ruft vor allem durch Lipopolysaccharide die Ausschüttung von Zytokinen hervor. Diese starke Reaktion zahlreicher Zelltypen stimuliert die angeborene Immunantwort und führt dadurch zur Gewebeerstörung (Taylor et al. 2010). Insgesamt nimmt die Pathogenität der Plaque zu, je mehr gramnegative, bewegliche und anaerobe Keime vorliegen (Hellwig et al. 2006). Es gilt nach wie vor der Grundsatz: „ohne Bakterien keine Parodontitis“, jedoch müssen Bakterien nicht zwangsläufig eine Parodontitis verursachen (Rateitschak et al. 2003).

### 2.3.2 Einflüsse exogener Faktoren

Dass Umweltfaktoren bei der Manifestation der Parodontitis eine wichtige Rolle spielen ist bekannt. Dazu zählen orale Faktoren (Mundhygiene), Verhaltensfaktoren (Alkoholkonsum, Rauchen, Stress), soziodemographische Faktoren (Alter, Geschlecht) und systemische Faktoren (Diabetes mellitus, Immunerkrankungen, Adipositas). Diese Elemente können die entzündliche Reaktion in Zusammenhang mit der Parodontitis verstärken (Stabholz et al. 2010).

Die Mundhygiene korreliert mit der Infektion und stellt einen zentralen Einflussfaktor auf die Erkrankung der Parodontitis dar. Bei 275 Bewohnern von Altenheimen, von denen weniger als ein Drittel zweimal täglich die Zähne putzten, also eine mangelhafte Mundhygiene aufwiesen, stellten Hopcraft et al. 2010 fest, dass der parodontale Zustand extrem schlecht war (35,6% der parodontalen Taschen waren über 4 mm tief, 10,2% über 6 mm).

Psychosozialer Stress durch negative Lebensereignisse, wie beispielsweise Arbeitslosigkeit, könnte mit der Erkrankung der chronischen Parodontitis assoziiert sein (Moss et al. 1996). Weiterhin kann Alkoholkonsum als ein Risikoindikator für Parodontitis angesehen werden (Da Silva Furtado Amaral et al. 2009). In Bezug auf das

Rauchverhalten wurde in über 325 Studien ein Zusammenhang zwischen Parodontitis und Rauchen festgestellt (Stabholz et al. 2010). Bisherige Daten scheinen zu zeigen, dass Raucher mit einem schlechteren parodontalen Status nicht unbedingt auch eine schlechtere Mundhygiene haben, dass allerdings das Rauchen einen chronischen Effekt auf das parodontale Gewebe hat, indem es unter anderem die Durchblutung mindert. Es bedarf noch der Klärung, ob Tabakkonsum auch einen Einfluss auf die Zusammensetzung der oralen Bakterienflora hat. Wenn man die Daten über den Einfluss des Rauchens auf die Wirtsantwort betrachtet, wird klar, dass Nikotin und andere Tabakstoffe Gefäß-, Entzündungs- und Immunzellen, sowie Zellen die zur Gewebeheilung beitragen beeinflussen (Zee et al. 2009). Nikotin hat auch direkte lokale Auswirkungen, wie die verstärkte Produktion von Kollagenasen und inflammatorischen Mediatoren. Es vermindert die Anheftung von Fibroblasten an der Wurzelhaut, was die stärkere Gewebezerstörung bei Rauchern erklären könnte (Johnson et al. 2004). Bergström et al. stellte 1989 fest, dass Raucher ein 2,5fach höheres Risiko haben, an schwerem parodontalen Gewebeverlust zu leiden als Nichtraucher. Patienten, die an der Systemerkrankung Diabetes mellitus leiden, haben ein 3fach höheres Risiko, an Parodontitis zu erkranken (Soskolne et al. 1998). Funktionen von Immunzellen wie von T-Zellen, neutrophilen Granulozyten und Monozyten, scheinen durch die Hyperglykämie beeinflusst zu werden. Die nachfolgende Dysregulation von Zytokinen kann zu Gewebezerstörung in Form von Knochenabbau führen (Taylor et al. 2013). Wie schwer der Krankheitsverlauf bei einem Diabetiker ist, hängt allerdings davon ab, wie gut der Stoffwechsel kontrolliert und eingestellt wird (Nunn et al. 2003, Tervonen et al. 1993). Weitere Risikoindikatoren könnten Osteoporose und Immunerkrankungen wie beispielsweise AIDS sein (Murray et al. 1994). HIV-seropositive Patienten entwickeln oft eine nekrotisierende ulzerative Gingivitis (NUG) oder eine nekrotisierende ulzerative Parodontitis (NUP) (Feller et al. 2006).

Adipositas konnte in einigen Studien mit Parodontitis in Verbindung gebracht werden. Diese Erkrankung hat metabolische Veränderungen zur Folge, die wiederum Einfluss auf das Immunsystem nehmen können (Bezerra et al. 2007).

Soziodemographische Faktoren, wie das Alter und das Geschlecht könnten ebenfalls mit Parodontalerkrankungen assoziiert sein. So tritt Knochenabbau bei älteren Menschen häufiger auf. Männer sind schwerer vom Attachmentverlust betroffen als weibliche

Patienten (Nunn et al. 2003). Denkbare Gründe für eine höhere Prävalenz von parodontalen Problemen im Alter sind die Plaquekontrolle, allgemeine Erkrankungen und Funktionsstörungen, Medikamenteneinnahme, anatomische, physiologische und morphologische Faktoren, das Regenerationspotential sowie die Immundefunktion. Die Heilungsprozesse scheinen im Alter zudem immer mehr eingeschränkt zu sein. Es kommt außerdem zu strukturellen Alterungsprozessen der Gingiva, des Desmodonts und des Knochens (Rateitschak et al. 2003).

Differenzen hinsichtlich des Geschlechts könnten dadurch hervorgerufen werden, dass Männer häufiger rauchen als Frauen und eine schlechtere Mundhygiene aufweisen. Außerdem wird der Einfluss von Genen, die durch geschlechtsspezifische Steroidhormone reguliert werden, als mögliche Ursache diskutiert. Die geschlechtsabhängige Produktion von Entzündungsmediatoren könnte das erhöhte Risiko für Gewebeerkrankung bei Männern erklären (Shiau et al. 2010).

### 2.3.3 Reaktionen des Immunsystems

Bei entzündlichen Parodontalerkrankungen kann man nicht zwischen den klassischen Phasen einer akuten und einer chronischen Entzündungsreaktion unterscheiden, da diese nebeneinander existieren. Traditionell werden entzündliche Prozesse in drei Phasen unterteilt: in eine akute, in eine immunologische und in eine chronische Phase. Dabei ist die akute Phase charakterisiert durch die Einwanderung neutrophiler Granulozyten, Vasodilatation und verstärkte Permeabilität der Gefäße. Die immunologische Phase ist gekennzeichnet durch das Auftreten Antigen präsentierender Zellen. In der chronischen Phase sind Plasmazellen aktiv, die Antikörper produzieren (Müller 2011). Neben der histologisch-strukturellen Beschreibung von Page und Schröder 1976, gibt es die Möglichkeit die Pathogenese der Parodontitis unter molekularbiologischen Aspekten zu betrachten. Hier wird der Fokus auf bedeutende Aktivitätsänderungen des Immunsystems gelegt (Rateitschak et al. 2004). Initial ausgelöst wird die Immunreaktion durch ortsständige Zellen des Parodontiums und Leukozyten, welche das angeborene Immunsystem aktivieren, indem sie über Toll-like-Rezeptoren (TLRs) und Nukleotid-bindende Oligomerisationsdomänen (NODs) Bestandteile von Bakterien wie Lipopolysaccharide, Peptidoglykane und bakterielle DNA erkennen (Mahanonda et al. 2007). Entzündungsmediatoren wie beispielsweise proinflammatorische Zytokine (IL-1, IL-6, IL-8) und Tumornekrose Faktor (TNF) werden freigesetzt, was zur weiteren Leukozyteneinwanderung führt (Wilson et al. 1996). Auch das erworbene

Immunsystem erkennt bakterielle Antigene mit Hilfe von antigenpräsentierenden Zellen wie z.B. dendritischen Zellen. Dendritische Zellen prozessieren die bakteriellen Antigene zu proteolytischen Peptiden und laden diese auf die Moleküle *major histocompatibility complex MHC I und II*. Anschließend wandern sie zu den sekundären lymphatischen Organen und präsentieren den T-Lymphozyten die Antigene, wodurch sie die Antigen-spezifische Immunantwort auslösen. Die T-Zellen erkennen nachfolgend über einen T-Zell-Rezeptor den MHC-Komplex (Guernonprez et al. 2002, Cutler et al. 2004).

Es kann anschließend zur etablierten gingivalen Läsion kommen. Bei anhaltender Plaqueakkumulation entsteht eine Ansammlung von T-Lymphozyten. Neben dendritischen Zellen transportieren auch Langerhanszellen und Makrophagen antigenes, bakterielles Material in die regionären Lymphknoten, wo Plasmazellen spezifische Antikörper produzieren, die über den Blutkreislauf in die Gingiva gelangen. Dieses Erkrankungsstadium kann sich nach unbestimmter Zeit zu einer fortgeschrittenen Läsion und damit zur Parodontitis entwickeln (Müller 2001).

In einer ausgeprägten parodontalen Tasche befinden sich mehr  $CD4^{+}$ - als  $CD8^{+}$  T-Zellen (Nagasawa et al. 1995). Die Zellen des erworbenen Immunsystems lassen sich in B-Zellen und in T-Zellen einteilen, auf denen wiederum  $CD4$ - und  $CD8$ -Rezeptoren vorkommen.  $CD4^{+}$ -T-Zellen sind Helferzellen, die zu Th1-Helferzellen (Makrophagenaktivierung) oder zu Th2-Helferzellen (Unterstützung der B-Zellen bei der Entwicklung zu Plasmazellen) differenzieren (Klinke et al. 2005, Kaufmann et al. 2014). In einer modellhaften Hypothese von Ohlrich et al. 2009 wird vermutet, dass die Immunregulation unter anderem vom Verhältnis zwischen den T-Zell-Unterklassen Th1-Zellen und Th2-Zellen abhängen könnte. Eine starke angeborene Immunantwort könnte für die Produktion eines hohen  $IL-12$  Spiegels durch Makrophagen und polymorphkernige Neutrophile verantwortlich sein. Dies führt wiederum zu einer Th1-Zell-Immunantwort mit wirksamen Antikörpern, die in einer stabilen parodontalen Läsion resultiert.

Im Gegensatz dazu könnte es durch eine schwache angeborene Immunantwort mit der Aktivierung polyklonaler B-Zellen zu einer Th2-Zell-Immunantwort mit nichtprotektiven Antikörpern und somit zu einer fortschreitenden parodontalen Läsion kommen. Dabei bleibt die Frage offen, was ursächlich für die eine oder die andere Immunreaktion sein könnte. Es bedarf weiterer Forschung zur Bestätigung dieser Hypothese (Ohlrich et al. 2009).



Dieser Prozess kann zu irreversiblen Schäden (Knochenabbau) am Parodont führen. Möglicherweise führt die Immunantwort über den Weg der Th2-Zellen und der B-Zellen zur Produktion von Autoantikörpern gegen Bestandteile des parodontalen Gewebes wie Kollagen, Spectrin oder Tubulin, und somit zu Gewebeerstörung (Koutouzis et al. 2009). Die Veränderung der Immunzellen von Makrophagen und T-Zellen in der stabilen Läsion, hin zu einer steigenden Anzahl von B- und Plasma-Zellen in der fortschreitenden Läsion, könnte das Ergebnis einer fortwährenden Anwesenheit von Pathogenen und einer uneffektiven Th1-Zell-Immunantwort sein. Vermutlich durch die Stimulation von Mastzellen wird Interleukin 4 produziert, was zu einer Th2-Zell Immunantwort führt. Während Mediatoren wie Interleukin 2 und Interferon (INF) gamma die zelluläre Immunantwort anregen, unterdrückt das Th2-Zytokin Interleukin 4 diese Immunantwort und steigert die humorale Immunantwort. Eine weitere Unterklasse der T-Helferzellen, sogenannte Th-17 Zellen, welche durch die Produktion von Interleukin 17 gekennzeichnet sind, beeinflussen die Th1/Th2 Reaktion. Die Entwicklung von Th-17-Zellen ist unter anderem abhängig von der Anwesenheit von Interleukin 23 und Interleukin 6 und könnte zur Produktion von Matrixmetalloproteinasen und zur gesteigerten Expression von RANKL (*receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand*) auf Osteoblasten führen, was letztendlich in Osteoklastenformation und Knochenzerstörung resultieren könnte (Ford et al. 2010). RANKL wird sowohl von Immunzellen als auch von osteogenetischen Zellen produziert. RANK, der zugehörige Rezeptor, wird auf Progenitorzellen aktiviert, die dann zu mehrkernigen Osteoklasten differenzieren. Die Osteoklastogenese wird durch OPG (*Osteoprotegerin*) inhibiert, das mit RANK um RANKL konkurriert. Im Mausmodell wurde gezeigt, dass ohne RANK oder RANKL keine Osteoklasten vorhanden sind. Proinflammatorische Zytokine können dieses komplexe System modulieren (Gruber et al. 2010). Cochran et al. wiesen 2008 eine gesteigerte Expression von RANKL in entzündlichem parodontalen Gewebe nach. Tumornekrosefaktor (TNF) kann in Abwesenheit von RANKL Knochenresorption durch Osteoklasten induzieren (Kobayashi et al. 2000). Zytokine des angeborenen Immunsystems (IL-1 $\beta$  und IL-6) wurden in Zusammenhang mit der Osteoklastogenese und der Einwanderung von Entzündungszellen gebracht (Graves 2008, Fonseca et al. 2009). Neben inflammatorischen Mediatoren können auch Gewebemediatoren, wie Prostaglandin E<sub>2</sub> die osseoresorptive Funktion der Osteoklasten steigern und somit zu fortschreitendem Knochenabbau führen (Tsai et al. 1998).

## 2.4 Genetischer Hintergrund

Ganz oder teilweise genetisch bedingte Erkrankungen werden in zwei Gruppen eingeteilt: in monogenetisch vererbte Krankheiten und in Erkrankungen mit komplexem Vererbungsmuster. Bei erstgenannten Erkrankungen folgt die Vererbung einem der Mendelschen Erbgänge (autosomal-dominant, autosomal-rezessiv oder x-oder y-chromosomal). In den meisten Fällen führt die Veränderung eines einzigen Gens zur Ausprägung eines wiedererkennbaren ähnlichen Phänotyps. Monogenetisch vererbte Erkrankungen kommen in der Bevölkerung sehr selten vor (unter 0,1%). Die Auswirkungen von monogenetisch vererbten Erkrankungen können teilweise zur gänzlichen Veränderung eines Genproduktes bis hin zum Funktionsverlust und zur Störung kompletter biologischer Prozesse führen (Kinane et al. 2005, Buselmaier/Tariverdian 2007).

Genetisch-komplexe Erkrankungen unterscheiden sich von entsprechend den Mendelschen Gesetzen vererbten Krankheiten in einigen wichtigen Punkten. Erkrankungen mit komplexem Erbgang haben eine höhere Prävalenz und treten mit einer Häufigkeit von über 1% in der Bevölkerung auf. Diese Erkrankungen folgen nicht dem einfachen Muster familiärer Verteilung oder Transmission, sondern sind Ergebnis der Interaktion von Allelen an vielen verschiedenen Orten im Genom. Die genetischen Variationen, die für die meisten polygenetisch vererbten Erkrankungen verantwortlich sind, kommen gemeinschaftlich in der Bevölkerung vor und treten in betroffenen und in nicht betroffenen Individuen auf. Polygen bedeutet, dass eine Anzahl verschiedener Gene involviert sind. Die neu entstandenen genetischen Varianten haben weitgehend normale biologische Funktionen zur Folge sind also allein niemals ausreichend ein Krankheitsbild auszulösen (Kinane et al. 2003).

Laut der ‚*common disease-common variation hypothesis*‘ (Juran et al. 2007) ist die genetische Variation nicht zwangsläufig die direkte Ursache komplexer Erkrankungen. Eine einzelne genetische Veränderung spielt womöglich nur eine untergeordnete Rolle in Bezug auf die Krankheit, kann jedoch in Zusammenhang mit anderen genetischen Veränderungen den Krankheitsverlauf beeinflussen. Teilweise sind zusätzlich Umwelteinflüsse nötig, um die Krankheit überhaupt zu entwickeln (Juran et al. 2007, Kinane et al. 2003).

Um den genetischen Hintergrund komplexer Erkrankungen näher zu erforschen, werden Polymorphismen unter anderem im Rahmen von Fall-Kontrollstudien untersucht (Kinane et al. 2005).

## 2.4.1 Formen von Polymorphismen

### 2.4.1.1 Einzelnukleotid-Polymorphismen

Single-nucleotid-Polymorphismen (SNPs) sind einzelne DNA Nukleotid Basenpaare, die sich innerhalb der individuellen DNA Sequenz unterscheiden. SNPs können entweder in homozygoten Formen oder in einer heterozygoten Form auftreten.

Millionen von SNPs wurden im menschlichen Genom gefunden. Ein SNP kommt mit einer Häufigkeit von mehr als 1% in der Population vor (Rotimi et al. 2010, Burtis et al. 2012). Die genetische Veränderung, die ein Einzelnukleotid-Polymorphismus nach sich zieht, sowie dessen Einfluss auf die Funktion des Gens und des zugehörigen Proteins für das es kodiert, ist ausschlaggebend dafür, ob der Polymorphismus phänotypisch in Erscheinung tritt bzw. zur Manifestation einer Krankheit beiträgt (Kinane et al. 2005). Meist durch Ablesefehler in der Replikation kommt es zum Austausch, zum Verlust oder zum Einfügen einzelner Nukleotide in der DNA (Murken et al. 2011). Eine Änderung der Basensequenz kann das Ablesen des Triplet-Raster-Codes beeinflussen, denn jeweils drei Nukleotide bestimmen eine Aminosäure. Ist eine kodierende Stelle im Genom betroffen können veränderte und teils unbrauchbaren Proteine resultieren. Dies kann wiederum das Risiko eine Erkrankung zu entwickeln steigern oder senken. Die physiologische Funktion der veränderten Proteine kann durch Umwelteinflüsse wie z.B. Rauchen oder bakterielle Faktoren zusätzlich beeinflusst werden (Kinane et al. 2003).

### 2.4.1.2 Mikro/Minisatellitenpolymorphismen und Kopienzahlvariationen

Bei Mikro- bzw. Minisatelliten handelt es sich um Wiederholungen von kurzen Nukleotidsequenzen. Die Zahl der Wiederholungen ist in einer Population individuell unterschiedlich und kann zwischen fünf und hundert variieren (Folwaczny 2012, Breen 2010, Nakamura 2009). VNTRs (*variable number tandem repeats*) unterteilt man je nach Größe der wiederholten Sequenz in Mikrosatelliten- ( $\leq 5$  Nukleotide) oder in Minisatellitenpolymorphismen ( $> 5$  Nukleotide). Mikrosatelliten machen ca. 2% des Genoms aus und gelten als Hotspots für Mutationen (Buselmaier 2007, Murken et al. 2011). Es ist die Anzahl der Wiederholungen, und nicht die Nukleotidsequenz, die die allelischen Polymorphismen unterscheidet (Hodge und Michalowicz 2001).

Bezüglich Mikrosatelliten und der Erkrankung Parodontitis wurde auf Chromosom 19 ein Locus, der mit schwerer chronischer Parodontitis in Verbindung gebracht werden konnte, identifiziert und stellt einen nützlichen Marker dar, um das Erkrankungsrisiko abzuschätzen (Tabeta et al. 2009). In einer Studie von 2003 wurde ein

Mikrosattelitenmarker im IFNGR1 Gen verwendet und ein Zusammenhang mit diesem Gen in Kombination mit dem Risikofaktor Rauchen festgestellt. Dies unterstreicht wiederum das Model des Zusammenspiels zwischen Genen und Umwelt für die Wahrscheinlichkeit an Parodontitis zu erkranken (Fraser et al. 2003).

Lange wurde angenommen, dass Gene nur in zwei Kopien, einer väterlichen und einer mütterlichen Kopie vorliegen, es gibt jedoch bei einigen Genen eine unterschiedliche Anzahl an Kopien (Beckmann et al. 2007). Sogenannte Kopienzahlvariationen (*copy number variants*, CNVs), sind DNA Segmente von tausend bis zu mehreren Millionen Basenpaaren. Manche Gene kommen im Vergleich zu einem Referenzgenom vervielfacht vor (Duplikation), gar nicht (Deletion), als einzelnes Gen oder als large-scale copy-number Variationen (Feuk et al. 2006). Individuen lassen sich durch das Fehlen oder Vorkommen von Kopienzahlvariationen eindeutig unterscheiden (Redon et al. 2006).

DNA-Kopienzahlvariationen können mit bestimmten Krankheiten wie beispielsweise der Glomerulonephritis assoziiert werden (Murken et al. 2011). Kopienzahlvariationen konnten auch in Zusammenhang mit *M. Crohn* gebracht werden (Bentley et al. 2010). Auf Basis von Kopienzahlvariationen liegt der genetische Unterschied zwischen zwei nicht verwandten Individuen bei ca. 1%. Das Genom von zwei zufällig ausgewählten Individuen, die nicht verwandt sind, unterscheidet sich bezogen auf Einzelnukleotidpolymorphismen zu nur ca. 0,1%.

Der Unterschied bezogen auf die Kopienzahlvariationen ist also erheblich größer (Folwaczny et al. 2012, Beckmann et al. 2007, Redon et al. 2006).

#### 2.4.2 Vererbung der Parodontitis

Die chronische Parodontitis wird als Erkrankung mit komplexem Erbgang bezeichnet, deren Phänotyp von vielen verschiedenen Faktoren unter anderem von Umweltfaktoren, einschließlich dem Rauchverhalten und der Plaquekontrolle beeinflusst wird. Für die Erforschung des genetischen Hintergrundes der Parodontitis sind vor allem Gene attraktiv, die für das Immunsystem kodieren. Jeder Prozess der Immunreaktion könnte in die Ätiologie der Parodontitis involviert sein, was die Suche nach genetischen Einflüssen durch die Vielzahl an Kandidatengenen erschwert (Kinane et al. 2005). Es gibt Hinweise, dass einige Polymorphismen im IL-1 Genlokus, im FcγR (*FC Gamma Rezeptor*) Gen, wie beispielsweise im FcγRIIB Gen (Sugita et al. 2012) sowie

im FcγRIIIa Gen (Chai et al. 2010) und in Genen die für den VDR (*Vitamin D Rezeptor*) und IL-10 kodieren mit der marginalen Parodontitis in bestimmten ethnischen Gruppen zusammenhängen könnten (Loos et al. 2005). Je mehr genetische Risikofaktoren ein Individuum geerbt hat, desto größer ist die genetische Prädisposition für die Manifestation der Erkrankung und desto höher die Möglichkeit eine Parodontitis frühzeitig zu entwickeln (Loos et al. 2005). Auch Hodge und Michalowicz beschrieben 2001 einige Gene, die mit überschießender Immunreaktion des Betroffenen und Parodontitis in Zusammenhang stehen könnten (IL-1A, IL-1B, TNFA, HLAD und der Vitamin D Rezeptor). Eine Studie von Fraser et al. 2003 zu möglichen genetischen Einflüssen auf die chronische Parodontitis unterstreicht, dass erst der Einfluss von Umweltfaktoren bei bestimmten Gen-Konstellationen zur Merkmalsausprägung führt.

#### 2.4.3 Assoziationsstudien als Methode der genetischen Analyse der chronischen Parodontitis

Eine genetische Assoziationsstudie ist eine aussagekräftige Methode, um kleine Geneffekte in komplexen Erkrankungen wie der chronischen Parodontitis zu ermitteln. Die Kosten für diese Analyse sind sehr hoch (Tabeta et al. 2009). Ziel genetischer Assoziationsstudien ist es einen Bezug zwischen Polymorphismen der Gene und bestimmten Merkmalen statistisch aufzuzeigen (Bickeböller et al. 2007). Assoziation beschreibt in der Genetik die Beziehung zwischen Allelen und der Ausprägung eines bestimmten Phänotyps beispielsweise einer bestimmten Erkrankung (Graw et al. 2010). Ein Zusammenhang zwischen Krankheit und Markern kann unter anderem über sogenannte Fall-Kontroll-Studien auf Populations- oder Familienbasis aufgeklärt werden. Man vergleicht dabei die Häufigkeit eines bestimmten Markerallels von Patienten und einer Kontrollgruppe. Kontroll- und Patientengruppe müssen aus genetisch möglichst identischen Subpopulationen stammen um systematische Fehler auszuschließen (Buselmaier et al. 2007). Die Aufmerksamkeit wird vor allem deswegen auf Assoziationsstudien gerichtet, da man durch diese auch schwächere genetische Effekte aufspüren kann (Hodge 1994, Kinane et al. 2003). Wird eine positive Assoziation gefunden, sind folgende Interpretationen möglich: Erstens das assoziierte Allel selbst macht anfällig für die Krankheit, zweitens das assoziierte Allel ist im Kopplungsungleichgewicht mit einem prädisponierenden Allel, drittens die Assoziation wird festgestellt, weil die Studienpopulation eine Stratifikation aufweist, oder viertens die Assoziation ist ein Artefakt. Im ersten Fall ist der Marker selbst der für die

Krankheit prädisponierende Locus. In den anderen Fällen ist der assoziierte Polymorphismus nicht unmittelbar krankheitsauslösend (Hodge 1993, Kinane 2003).

Direkte Assoziationsstudien sind als solche Fall-Kontrollstudien aufgebaut und suchen nach Kandidatengenen, die für einen bestimmten Krankheitsphänotyp verantwortlich sein könnten (Murken et al. 2011). Es werden Genvarianten in nur wenigen Genen untersucht, die ausgewählt wurden entweder nach der Lage im Genom, nach der molekularbiologischen Funktion oder dadurch, dass bei Patienten, die erkrankt sind, das Genprodukt vermehrt exprimiert wird (Huang et al. 2003). Bezogen auf die chronische Parodontitis werden meist Kandidatengene, welche die Immunantwort modulieren, indem sie auf Chemokine, Enzyme, Zytokine oder Rezeptoren auf der Zelloberfläche Einfluss nehmen, zur Untersuchung herangezogen (Yoshie et al. 2007).

Indirekte Assoziationsstudien beschränken sich nicht auf ein oder wenige Gene, sondern dienen der ungerichteten Suche im gesamten Genom ohne die Auswahl von Kandidatengenen. Bei genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) werden hochauflösende DNA-Chips verwendet, welche die gleichzeitige Typisierung vieler SNPs einer Person zulassen, wobei mehrere unabhängige Studiengruppen untersucht werden, die meistens mehrere tausend Personen umfassen (Murken et al. 2011). GWAS bieten die Möglichkeit, beteiligte Gene an häufig vorkommenden Erkrankungen zu identifizieren, wobei 500.000-1.500.000 SNPs bei jedem Studienteilnehmer genotypisiert werden (Wellcome Trust Case Control Consortium 2007). 99,5% des menschlichen Genoms ist identisch, 0,5% des Genoms sind verantwortlich für individuelle Unterschiede, auch für die Wahrscheinlichkeit anfällig für eine Erkrankung zu sein. Indirekte Assoziationsstudien stellen eine Möglichkeit dar, das ganze menschliche Genom nach diesen genetischen Varianten abzusuchen (Roberts et al. 2010). Trotz der Tatsache, dass mehr als 600 genomweite Assoziationsstudien publiziert wurden, die 150 Krankheiten abdecken und in denen bis zu 800 SNPs, die als signifikant gelten, gefunden wurden, gilt es noch herauszufinden, wie Variationen in intronischen und intergenetischen Regionen die Genexpression beeinflussen. Dadurch werden möglicherweise weitere genetische Varianten aufgedeckt, wodurch wiederum individuelle Therapien verbessert werden könnten (Manolio et al. 2010). Die untersuchten Polymorphismen in dieser Arbeit wurden aus GWAS zum genetischen Hintergrund von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ausgewählt. Dies ist ein

neuer Ansatzpunkt, um mögliche Kandidatengene der chronischen Parodontitis zu finden.

## 2.5 Die untersuchten Polymorphismen

Viele komplexe Erkrankungen wie chronisch entzündliche Darmerkrankungen, Erkrankungen der koronaren Herzgefäße, Diabetes Typ 2, Tumorerkrankungen, Lepra und andere immunvermittelte Krankheiten teilen gemeinsame genetische Risikofaktoren. Dieses Phänomen der Pleiotropie tritt auf, wenn ein Gen Auswirkungen auf mehrere Phänotypen hat (Vaithilingam et al. 2014, Sivakumaran et al. 2011). Pleiotropische Erkrankungen die mit *Morbus Crohn* in Verbindung stehen, sind unter anderem Lepra (über *NOD2* und *TNFSF15*) und myeloproliferative Neoplasmen (über *JAK2*). Gene, die als Kandidatenloci für diese anderen Erkrankungen identifiziert wurden, können für Assoziationsstudien zur chronischen Parodontitis herangezogen werden (Vaithilingam et al. 2014). Die mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen assoziierten SNPs rs4263839 (*TNFSF15*), rs10758669 (*JAK2*) und rs2066844 bzw. rs2066845 (*NOD2*) (Cho et al. 1998, Prager et al. 2012, Oruga et al. 2001, Wagner et al. 2013), stellen somit interessante potentielle genetische Einflussfaktoren auf die Erkrankung der chronischen Parodontitis dar. Auch der SNP rs4986790 (*TLR4*) konnte sowohl mit der chronischen Parodontitis als auch mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen in Verbindung gebracht werden (Browning et al. 2007, Schröder et al. 2005). Für Patienten, die an chronisch entzündlichen Darmerkrankungen leiden, besteht außerdem ein signifikant erhöhtes Risiko auch an chronischer Parodontitis zu erkranken (Papageorgiou et al. 2017).

In ihrer Ätiologie und Pathogenese haben chronisch entzündliche Darmerkrankungen und die Parodontitis einige Gemeinsamkeiten. Die Pathogenese beider Erkrankungen ist multifaktoriell, sie führt zu einem Substanzdefekt der Mukosabarriere, Deregulation der Immunantwort und einer chronischen Entzündung der Mukosa. Umweltfaktoren, Alter, Lebensumstände und dysbiotische Bakterien sind Schlüsselemente in der Pathogenese beider Erkrankungen, ebenso wie die genetische Prädisposition (Indriolo et al. 2011). Die Kombination dieser Hauptfaktoren trägt sowohl zur Entwicklung einer Parodontitis als auch einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung bei (Papageorgiou et al. 2017, Indriolo et al. 2011, Brandtzaeg et al. 2001). Auch der Nikotinabusus konnte mit beiden Erkrankungen in Verbindung gebracht werden (Papageorgiou et al. 2017, Huijjoel et al. 2002, Mahid et al. 2006). Die durch genetische Polymorphismen des Wirts begünstigte

überschießende Immunreaktion und die gestörte epitheliale Barriere könnte gemeinsame Ursache beider Erkrankungen sein (Lira-Junior et al. 2016, Sartor 2008). Sowohl chronische Parodontitis als auch chronisch entzündliche Darmerkrankungen zeichnen sich außerdem durch einen schubweisen Verlauf aus (Brandtzaeg et al. 2001). Weiterhin setzt sich die orale Mikroflora bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eher aus gram-negativen anaeroben beweglichen Stäbchen zusammen. Sie weisen eine höhere Anzahl parodontalpathogener Keime im Vergleich zu gesunden Probanden auf (Brito et al 2013).

Die entzündliche Immunantwort scheint jedoch der Schlüsselfaktor der Beziehung beider Erkrankungen zu sein (Flemmig et al. 1991, Brito et al. 2008, Kinane& Bartold et al. 2007, Bouma et al. 2003). Bei der parodontalen Entzündungsreaktion, hervorgerufen durch Bakterien, führen lysosomale Enzyme, produziert von neutrophilen Granulozyten, zu Gewebeerstörung in der parodontalen Tasche. Daraufhin wandern vermehrt Bakterien ein und zerstören, in Kombination mit ihren Produkten, weiteres Gewebe. Sie interagieren mit anderen Zellen wie Makrophagen, dendritischen Zellen und T-Zellen, die wiederum proinflammatorische Zytokine wie TNF und IL-1 $\beta$  ausschütten. Th1- und Th17-Zellen werden aktiviert, was die Entzündungsreaktion noch verstärkt. Neutrophile Granulozyten und aktivierte Lymphozyten exprimieren RANKL, ein Mitglied der TNF Superfamilie. Es kommt zu Osteoklastogenese und Knochenabbau.

Ähnliches spielt sich bei *Morbus Crohn* ab: durch das Auftreten von Pathogenen, die eine erhöhte Virulenz aufweisen, wie beispielsweise bestimmte Stämme von *Escherichia coli*, ein fakultativ anaerobes gramnegatives bewegliches Stäbchen (Sartor et al 2008) kommt es zu einer Veränderung der mikrobiellen Zusammensetzung der Darmflora. Folglich wird die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 und TNF) durch Epithelzellen, dendritische Zellen und Makrophagen induziert. Daraufhin werden Th1- und Th17-Zellen aktiviert, und entsprechende Zytokine wie IL-17 produziert, wodurch wiederum die Neutrophileneinwanderung in die Darmmukosa stimuliert wird. Dadurch wird die Darmmukosa zerstört und es kommt zu einer Entzündungsreaktion durch lysosomale Enzyme und andere Mediatoren. Das Zytokinprofil beider Erkrankungen ist also ähnlich. Eine Störung innerhalb eines streng kontrollierten Netzwerks von Zytokinen mit abnormalen Signalwegen zwischen den verschiedenen Zelltypen der Schleimhaut könnte ein erster Schritt für eine chronische



Entzündungsreaktion bei diesen Krankheiten sein (Agossa et al. 2016, Hjihsengallis et al. 2014, de Souza et al. 2016, Brandtzaeg et al. 2001).

Zu den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, *Morbus Crohn* und *Colitis ulcerosa*, existieren zahlreiche GWAS, die verschiedene Suszeptibilitätsgene identifizieren konnten, darunter auch die in dieser Studie untersuchten Polymorphismen auf Chromosom 9 und Chromosom 16 (Barrett et al. 2008, Anderson et al. 2011, Juyal et al. 2011, Browning et al. 2007, McGovern et al. 2010). Da die Ätiopathogenese der beiden Erkrankungen (chronisch entzündliche Darmerkrankungen und chronische Parodontitis) Überschneidungen zeigt, besteht die Möglichkeit, dass die Erkenntnisse, die bei einer Erkrankung gewonnen werden, gegebenenfalls Hinweise auf die Pathogenese der anderen liefern. In dieser Studie wurden daher fünf Polymorphismen, deren zugehörige Gene das Immunsystem beeinflussen und die eine Rolle in Zusammenhang mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen spielen (Cho et al. 1998, Prager et al. 2012, Oruga et al. 2001, Wagner et al. 2013), in Bezug auf die chronische Parodontitis näher untersucht.

#### 2.5.1 Chromosom 9

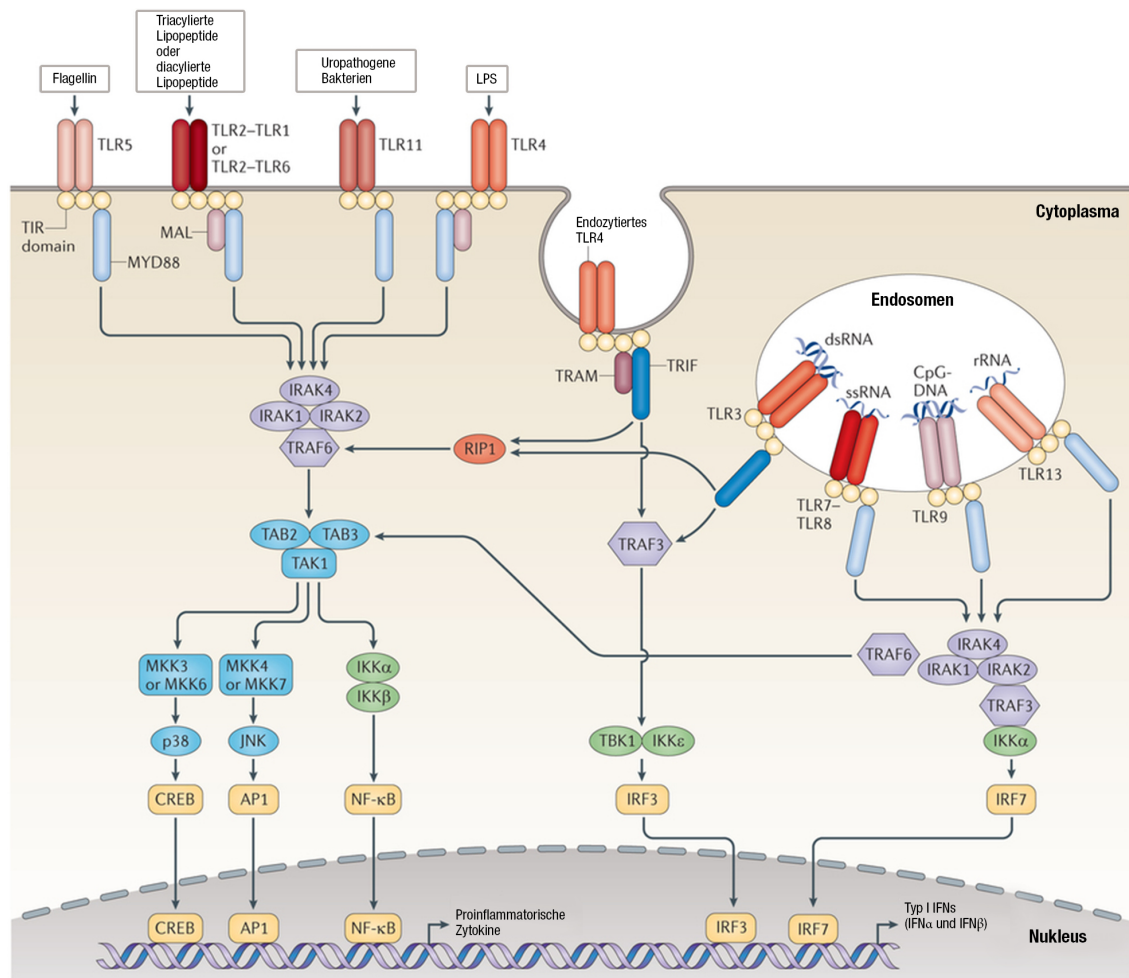
Auf Chromosom 9 wurden die Polymorphismen rs4986790, rs4263839 und rs10758669 ausgewählt, da diese in Zusammenhang mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen gebracht werden konnten und wie nachfolgend beschrieben in Genen liegen, die das Immunsystem beeinflussen.

##### 2.5.1.1 Polymorphismus rs4986790

Der zytogenetische Standort des SNP rs4986790 auf Chromosom 9 ist 9q33.1, das zugehörige Gen kodiert für den Toll-like-Rezeptor 4 (*TLR4*).

*Drosophila melanogaster*, eine Taufliege, dient als Modellorganismus in der Genetik und erleichtert es, den genetischen Hintergrund von Erkrankungen des Menschen besser zu verstehen. 75% der krankheitsauslösenden Gene beim Menschen, sind aufgrund der hohen Konservierung der Gene als funktionell homologe Gene bei der Taufliege *Drosophila melanogaster* wieder zu finden (Pandey et al. 2011). Bei *Drosophila melanogaster*, spielt der Toll Transmembranrezeptor eine zentrale Rolle in den Signalwegen, die die dorsal-ventrale Achsenbildung und die angeborene unspezifische Immunantwort steuern. *TLR4* ist ein Typ I-Transmembranprotein mit einer extrazellulären Domäne, bestehend aus einer Leucin-reichen Repeat-Region und einer

intrazellulären Domäne homolog zu der des menschlichen Interleukin-1-Rezeptors (Medzhitov et al. 1997). Die Familie der Toll-like Rezeptoren (TLR) ist involviert in die Ausschüttung von IL-1 und TNF $\alpha$  durch Monozyten und Makrophagen. Es wurde nachgewiesen, dass sowohl *TLR2* als auch *TLR4* in Makrophagen und in gingivalen Fibroblasten im entzündeten parodontalen Gewebe vermehrt exprimiert werden. In einer Studie von Schröder et al. wurde 2005 nachgewiesen, dass SNPs (Asp299Gly und Thr399Ile) des *TLR4* Rezeptors mit chronischer Parodontitis, jedoch nicht mit der aggressiven Parodontitis in Zusammenhang stehen (Barton et al. 2003, Mori et al. 2003, Schröder et al. 2005). Toll-like-Rezeptoren erkennen spezifisch charakteristische Bakterienbestandteile und werden vor allem von mononukleären Phagozyten und dendritischen Zellen exprimiert, die dadurch Erreger identifizieren. Die TLR-tragende Zelle kann dann entsprechende Abwehrreaktionen mobilisieren. TLR-Signale fließen in Signaltransduktionwege in deren Zentrum die Phosphorylierung von NF-Kappa-B steht (Abbildung 1), wodurch Makrophagen und dendritische Zellen proinflammatorische Zytokine sezernieren. Dendritische Zellen stimulieren außerdem T-Zellen und somit die erworbene Immunabwehr. *TLR4* erkennt vornehmlich Lipopolysaccharide (LPS) gramnegativer Bakterien, einschließlich parodontalpathogener Keime (Suerbaum et al. 2012, Nativel et al. 2017, Ogawa et al. 2007, Díaz-Zúñiga et al. 2015).



Nature Reviews | Immunology

Abbildung 1: TLR-Signalwege bei Säugetieren. *TLR4* ist sowohl an der Zelloberfläche lokalisiert, als auch am Endosom, wo mikrobielle Nukleinsäuren erkannt werden können. Die TLR Signalwege enden in der Aktivierung von Nuklear Faktor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), Interferon-reguierenden Faktoren (IRFs), Zyklischem AMP-responsivem Element-bindendem Protein (CREB) und Aktivator Protein 1 (AP1) (O'Neill et al. 2013). dsRNA: doublestranded RNA, IKK: Inhibitor of NF- $\kappa$ B Kinase, LPS: Lipopolysaccharid, MKK: MAP Kinase Kinase, RIP1: Rezeptor.interagierendes Protein1, rRNA: ribosomale RNA, ss RNA: single-stranded RNA, TAB: Tak1 bindendes Protein, TAK: TGF $\beta$  aktivierte Kinase, TBK1: TANK bindende Kinase 1 (Bildquelle O'Neill et al. 2013).

Die missense-Mutation rs4986790 Asp299Gly führt zu einer abgeschwächten Effizienz der Erkennung von Lipopolysacchariden und verminderter Entzündungsreaktion und somit zu erhöhtem Risiko einer durch gramnegative Bakterien induzierten Infektion (Agnese et al. 2002). Vornehmlich die bakterielle Infektion durch gram-negative Bakterien ist ein Auslöser für die Manifestation einer Parodontitis, jedoch spielen auch genetische Faktoren eine Rolle. Vor allem der NF-kappa-B Signalweg, auf den der Toll-like-Rezeptor 4 einen herausragenden Einfluss hat, ist ausschlaggebend für diese Erkrankung. Polymorphismen, die die Stimulation und Regulation von lipopolysaccharid-induzierten Entzündungsreaktionen beeinflussen, eignen sich somit,

den genetischen Hintergrund der Erkrankung der chronischen Parodontitis näher zu untersuchen (Medzhitov et al. 1997, Page et al. 1997, Page et al. 1999, Graves et al. 2000).

#### 2.5.1.2 Polymorphismus rs4263839

Der SNP rs4263839 ist auf Chromosom 9 (9q32) anzutreffen. Das zugehörige Gen ist das Tumor-Nekrose-Faktor-Liganden-Superfamilien Mitglied 15 (*TNFSF15*). *TNFSF15* gehört zur Familie der TNF-Liganden und kodiert für TL1A (*TNF-like cytokine 1A*). TL1A wird von Makrophagen, T-Zellen und dendritischen Zellen, die proinflammatorischen Stimuli oder Keimen ausgesetzt sind, exprimiert. Bindet TL1A an den DR3 Rezeptor (*death receptor 3*) auf aktivierten CD 4+ Zellen, wird durch ein ko-stimulierendes Signal die sekundäre Immunantwort angeregt. Es kommt zur Proliferation und Differenzierung von naiven CD 4+ Zellen zu Th17-Zellen (T-Helferzellen 17). Nachfolgend werden Interferon- $\gamma$  und Interleukin 17 produziert (Croft et al. 2009, Shih et al. 2009, Pappu et al. 2008, Meylan et al. 2008). Th17-Zellen werden wiederum durch Interleukin 23 beeinflusst. Sie induzieren eine neutrophilen-dominierte Entzündungsreaktion (Kaufmann et al. 2014). Weiterhin stimuliert TL1A die NF-kappa-B Produktion und kann auch zur Apoptose führen (Migone et al. 2002). NF-kappa-B kontrolliert wiederum die Expression von Genen die für proinflammatorische Zytokine (IL-1, IL-2, TNF-alpha, IL-6 etc.), für Chemokine (RANTES, MCP1 etc.), für Adhäsionsmoleküle (ICAM, VCAM etc.), induzierbare Enzyme (COX-2 etc.), Wachstumsfaktoren, einige akute Phase Proteine und Immunrezeptoren kodieren, welche bei Entzündungsprozessen eine tragende Rolle spielen (Nam et al. 2006). In einer genomweiten Untersuchung fanden Cho et al. 1998 eine Verbindung zwischen diesem SNP und *Morbus Crohn* bzw. *Colitis ulcerosa*. In einer weiteren genomweiten Assoziationsstudie mit 484 japanischen *Morbus Crohn* Patienten und 1097 Kontrollpatienten identifizierten Yamazaki et al. 2005 hochsignifikante Assoziationen mit SNPs und Haplotypen des *TNFSF15* Genes. Picornell et al. schlussfolgerten 2007, dass *TNFSF15* tatsächlich mit der Wahrscheinlichkeit an einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung zu leiden, assoziiert ist. Barrett et al. identifizierten 2008 eine signifikante Assoziation zwischen rs4263839 und *Morbus Crohn*. Zum ersten Mal wurde eine vermehrte TL1A Expression bei Patienten mit *Morbus Crohn* und *Colitis ulcerosa* festgestellt (Bamias et al. 2003). Diese Ergebnisse zeigen, dass der *TNFSF15* Genpolymorphismus in Zusammenhang mit autoimmunen und entzündlichen

Erkrankungen steht, gegebenenfalls indem er zu einer veränderten TL1A Produktion führt. Die TL1A Expression wird durch Zytokine im Rahmen einer Entzündungsreaktion, durch TLR Liganden, sowie durch Bakterien und über den FcγR (*Immunoglobulin G fc Rezeptor*) Signalweg induziert. TLR1 kann zu Zellproliferation von T-Zellen und Zytokinausschüttung sowie zu Zelltod, Differenzierung und Erhaltung von Lymphozyten und auch zur Osteoklastogenese führen. TL1A verbindet das angeborene mit dem erworbenen Immunsystem indem dendritische Zellen, Makrophagen, Fibroblasten der Synovia oder Endothelzellen über den TLR1-DR3 Signalweg Th17-Zellen, Treg Zellen (regulatorische T-Zelle), Th1-Zellen oder NKT-Zellen (Natürliche Killer T-Zellen) stimulieren und autoimmun- oder entzündlich bedingte Erkrankungen beeinflussen (Aiba et al. 2013) (Abbildung 2).

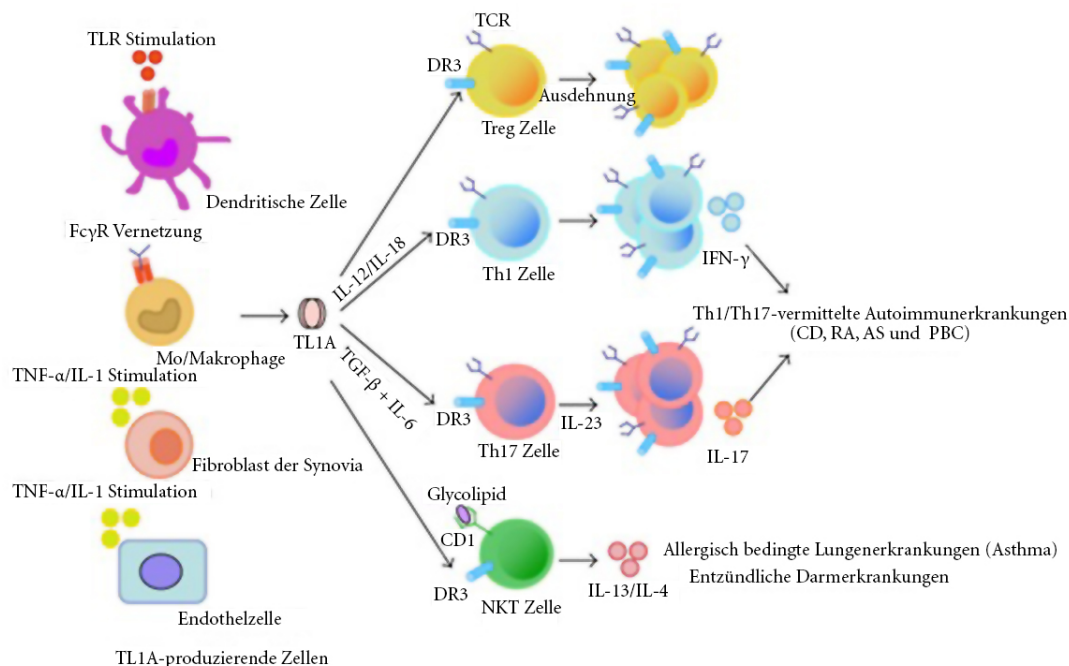


Abbildung 2: TL1A verbindet die angeborene Immunantwort mit der erworbenen Immunantwort und kann autoimmun bedingte oder entzündliche Erkrankungen induzieren (Bildquelle Aiba et al. 2013).

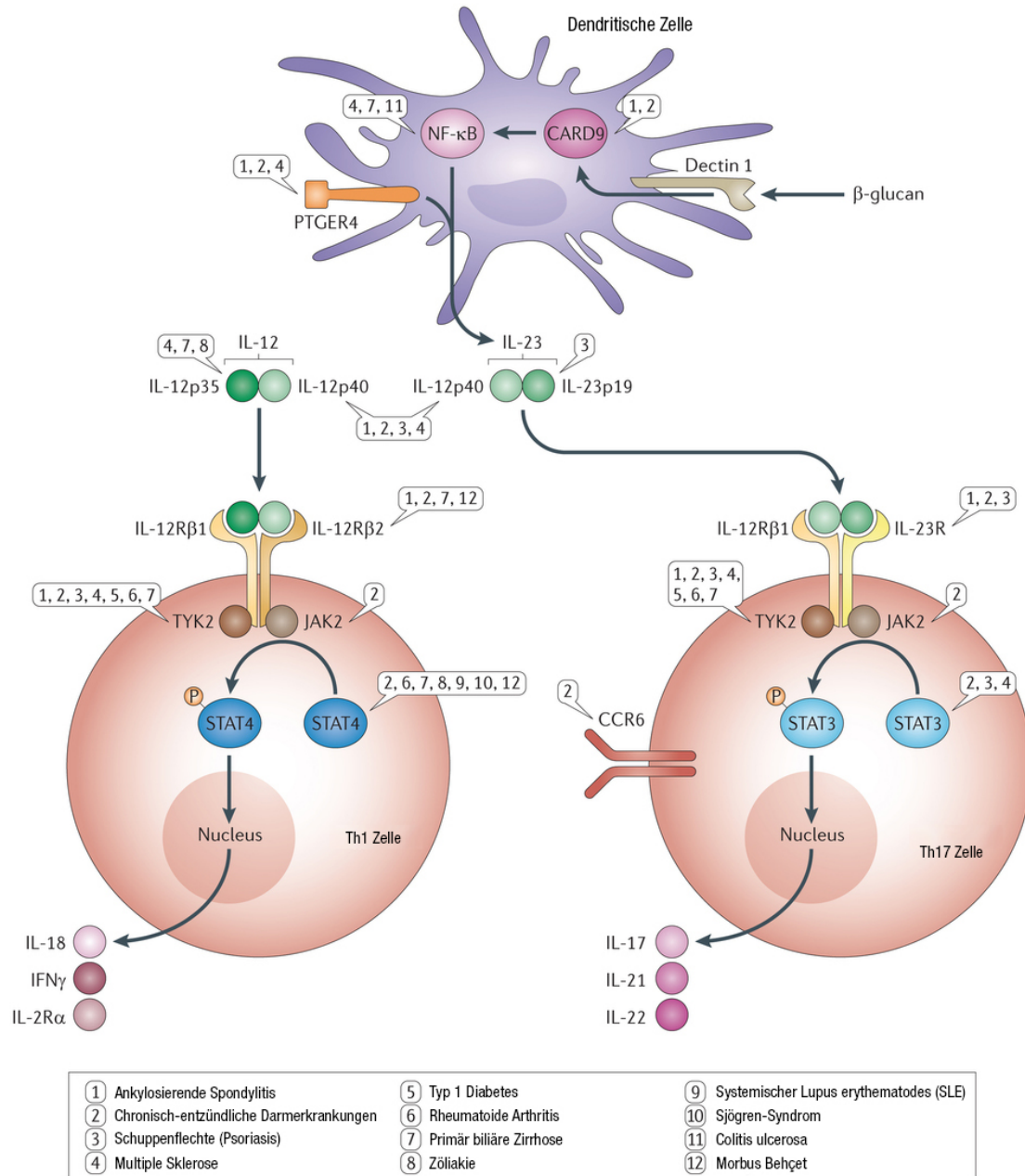
Die Parodontitis ist gekennzeichnet durch ein komplexes Wechselspiel zwischen dem Immunsystem und parodontalpathogenen Keimen. Sowohl Th1-Zellen (charakteristisch für die stabile frühe Läsion) und Th2-Zellen (assoziiert mit der fortgeschrittenen Läsion) als auch Th17-Zellen nehmen Einfluss auf diese Erkrankung (Gaffen et al. 2008). Diese Immunzellen werden wiederum unter anderem durch TL1A aktiviert.

Vergleichbar werden bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen über den TL1A/DR3 Signalweg aktivierte Lymphozyten kostimuliert und Th1-, Th2- und Th17-Zellen in der Darmmukosa hochreguliert. Dieser Signalweg könnte auch eine Rolle im Rahmen der mukosalen Homöostase und der Verteidigung gegen pathogene Keime spielen, da beispielsweise auch Treg Zellen (regulierende T Zellen) DR3 exprimieren und auf TL1A reagieren (Siakavellas et al. 2015). Bei der bakteriellen Infektionskrankheit Lepra, hervorgerufen durch *Mycobacterium leprae*, scheint *TNFSF15* eine weitere Rolle zu spielen, entweder über die Beeinflussung von NF-kappa-B oder durch Störung der Regulation von Interferon gamma, das von Th1-Zellen produziert wird und zur Reifung von Makrophagen führt, die wiederum antimykobakterielle Moleküle produzieren (Zhang et al. 2009). Da *TNFSF15* und TL1A Einfluss auf andere chronisch entzündliche Erkrankungen haben, scheint der Polymorphismus rs4263839 ein interessanter Kandidat zur näheren Untersuchung insbesondere auf die Immunreaktion bei Patienten mit chronischer Parodontitis zu sein.

#### 2.5.1.3 Polymorphismus rs10758669

Der SNP rs10758669 findet sich im Gen für die Janus Kinase 2 (*JAK2*), das auf Chromosom 9 (9p24) anzutreffen ist. *JAK2* kodiert für eine Thyrosinkinase, welche unter anderem hämatopoetische Wachstumsfaktoren aktiviert. *JAK2* spielt somit eine zentrale Rolle in der Modulierung stromabwärts gerichteter Signalwege von Schlüsselrezeptoren von Zytokinen, die für eine normale hämatopoetische Entwicklung erforderlich sind (Pardanan et al. 2008, Neubauer et al. 1998, Parganas et al. 1998). Pardanan et al. fanden 2008 einen Zusammenhang zwischen den *JAK2* SNPs rs10758669, rs3808850 und rs10974947 und *Polycythemia vera*, eine klonale Erkrankung der hämatopoetischen Stammzelle. Prager et al. konnten 2012 eine Verbindung zwischen *JAK2* rs10758669 und *Morbus Crohn* herstellen. Patienten die das C Risikoallel in *JAK2* rs10758669 tragen, zeigen eine höhere Permeabilität der Darmmukosa, verglichen mit Patienten ohne das C Allel. Eine eingeschränkte Funktion der epithelialen Darmbarriere könnte somit ein Mechanismus sein, wie *JAK2* die Pathogenese von *Morbus Crohn* beeinflusst. Die Bakterieninvasion wird erleichtert, was wiederum zu vermehrter Entzündungsreaktion führen könnte. Genomweite Assoziationsstudien beleuchten in diesem Zusammenhang unter anderem auch den IL-23 Signalweg, in Bezug auf die Pathogenese von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Nachdem IL-23 an den Rezeptor bindet wird *JAK2* im IL23-

Rezeptor aktiviert. Der IL23/IL23-R Signalweg (Abbildung 3) spielt eine wichtige Rolle bei der angeborenen und erworbenen Immunantwort innerhalb der intestinalen Mukosa (Prager et al. 2012, Barrett et al. 2008, Craddock et al. 2010, Xavier et al. 2008, Murray et al. 2007).



Nature Reviews | Genetics

Abbildung 3: Assoziation zwischen Komponenten der IL-23R Immunantwort mit immun-vermittelten Erkrankungen. Viele Komponenten der Interleukin 23 Rezeptor (IL-23R) Immunantwort zeigen genomweite Assoziation mit einer Reihe von immun-vermittelten Erkrankungen hier im Kontext zu Th1- und Th17-Zellen dargestellt (Parkes et al. 2013). CARD9: caspase recruitment domain-containing protein 9, CCR6: CC Chemokine Rezeptor 6, IFN $\gamma$ : Interferon  $\gamma$ , JAK2: Janus Kinase 2, NF- $\kappa$ B: Nuclear factor  $\kappa$ B, PTGER4: Prostaglandin E 2 Rezeptor EP4 Subtyp, STAT3: signal transducer and activator of transcription 3, TYK2: Tyrosin Kinase 2 (Bildquelle: Parkes et al. 2013).

Im Allgemeinen werden Janus Kinasen durch extrazelluläre Zytokine aktiviert. Janus Kinasen phosphorylieren STATs (*signal transducers and activators of transcription*), eine Familie von sieben strukturell und funktionell verwandten Proteinen. Die so aktivierten STATs regulieren sowohl die angeborene als auch die erworbene Immunantwort, indem sie im Zellkern die Expression von Genen modulieren. Der JAK/STAT Signalweg wird initiiert, wenn ein Zytokin an den zugehörigen Rezeptor bindet. Diese Zytokinrezeptoren besitzen keine intrinsische Tyrosinkinaseaktivität, diese wird von den Janus Kinasen bereitgestellt. JAKs phosphorylieren die Tyrosine des Rezeptors. An den phosphorylierten Rezeptoren binden nun STATs, die wiederum von der Janus Kinase phosphoryliert werden und dann ihre Wirkung im Zellkern entfalten können. Die zugehörigen Rezeptoren zur Janus Kinase 2 (*JAK2*) sind Einfachketten-Rezeptoren, wie beispielsweise EpoR (*Erythropoietinrezeptor*), IL-3 Rezeptoren, gp130 (*Glykoprotein130*) Rezeptoren und Klasse 2 Zytokinrezeptoren (Kisseleva et al. 2002). Die Aktivierung von JAK stellt den initialen Schritt für die Entwicklung, das Überleben und die Proliferation von Lymphozyten dar. Auch eine Immunantwort, die durch T-Helfer-Zellen induziert wird, hängt von JAK ab. Neben dem Einfluss auf das Immunsystem stellen JAK Mediatoren für Wachstumsfaktoren dar (Ghoreschi et al. 2009). Bezogen auf das Immunsystem spielen Janus-Kinasen bei Signaltransduktionswegen von Zytokinen wie IL2-7 (Interleukin 2 bis 7) und GM-CSF (*Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor*) eine Rolle (Horn et al. 2003). Experimentelle Modelle zur chronischen Parodontitis geben wiederum Hinweise darauf, dass GM-CSF am Fortschreiten der Erkrankung beteiligt sein könnten (Lam et al. 2015).

Zytokine wie IL-2, IL-4 und IFN- $\gamma$  werden von Abwehrzellen und Endothelzellen gebildet und wirken über den JAK/STAT Signalweg (Horn et al. 2003). Diese und andere Zytokine spielen sowohl bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen als auch bei chronischer Parodontitis eine wichtige Rolle (Kmieć et al. 1998, Menegat et al. 2016, Souto et al. 2014).

Bindet beispielsweise IL-2 an seinen Rezeptor, kommt es zur Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges. IL-2 entfaltet seine Hauptwirkung auf die Zelle, von der es synthetisiert wurde. Bei T-Zellen führt es zu Zellwachstum und klonaler Expansion von T-Zellen sowie zur Ausschüttung von weiteren Zytokinen (IL-4, IFN- $\gamma$ ). Auch Natürliche Killerzellen werden durch IL-2 stimuliert und erhöhen ihre zytolytische



Aktivität. B-Zellen werden zur Proliferation und Antikörpersynthese durch IL-2 angeregt.

IL-4 wird vorwiegend von Th2-Zellen und Mastzellen gebildet, ist beteiligt am Antikörperwechsel zu IgE und stimuliert Th2-Zellen und Mastzellen zur Proliferation, wobei es die Makrophagenaktivierung hemmt. Die Abwehrlage wird in Richtung einer humoralen Immunantwort verschoben. IL-4 wirkt über einen JAK-assoziierten Rezeptor. Auch der Interferon- $\gamma$  Rezeptor (Th1-Zellen, CD8<sup>+</sup>-Zellen, NK-Zellen) leitet sein Aktivierungssignal über JAK/STAT weiter, aktiviert Makrophagen, fördert den Klassenwechsel zu IgG, stimuliert T-Zellen und NK-Zellen (Natürliche Killer-Zellen) (Horn et al. 2003). All diese Immunzellen (T-Zellen, NK-Zellen, B-Zellen Makrophagen etc.), die über Zytokine und JAK/STAT Signalwege beeinflusst werden sind an der Immunreaktion im Verlauf der chronischen Parodontitis beteiligt (Cekici et al. 2014).

Im Rahmen der parodontalen Entzündungsreaktion kommt es außerdem zur Einwanderung von neutrophilen Granulozyten aus den Gefäßen in das subepitheliale Bindegewebe. Vermittelt wird dieser Vorgang durch Adhäsionsmoleküle auf den neutrophilen Granulozyten und den Endothelzellen. Der Prozess wird durch einen chemotaktischen Gradienten beeinflusst. Endothelzellen exprimieren auch ICAM-1 (*interzellulären Adhäsionsmolekül 1*), das Leukozyten dazu befähigt, ins Gewebe zu wandern. Aktivoren dieses Vorgangs sind beispielsweise proinflammatorische Zytokine, Lipopolysaacharide, Interleukin-4 und Interferone (z.B. Interferon- $\gamma$ ) (Kinane et al. 2001). Der JAK2/STAT3 Signalweg nimmt über IL-1 $\beta$  oder IFN- $\gamma$  Einfluss auf die Expression von CAMs (Zelladhäsionsmoleküle wie ICAM-1, VCAM-1, E-selektin) in Endothelzellen, gegebenenfalls auch in Zusammenhang mit dem NF-Kappa-B-Signalweg (Lian et al. 2016). Die Janus Kinase 2 hat somit über ICAM-1 Bedeutung für die Einwanderung der neutrophilen Granulozyten im Zuge der Entzündungsreaktion im Verlauf der chronischen Parodontitis.

Endothelzellen produzieren außerdem VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), einen Faktor der über seine Rezeptoren Migration, Differenzierung und Proliferation verschiedener Zellen vermittelt und die vaskuläre Permeabilität erhöht. VEGF steht mit JAK2/STAT3 in Verbindung und könnte Einfluss auf diabetische Retinopathie nehmen. Bei Patienten mit Diabetes mellitus und chronischer Parodontitis konnten außerdem erhöhte VEGF Level im gingivalen Gewebe festgestellt werden. Diabetes mellitus könnte über VEGF Einfluss auf die chronische Parodontitis nehmen. VEGF ist ein

stromabwärts gerichtetes Protein des JAK2/STAT3 Signalweges (Ramaya et al. 2014, Unlü et al. 2003, Lei et al. 2018, Zheng et al. 2010).

Auch bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen konnten erhöhte VEGF Konzentrationen nachgewiesen werden (Kopanakis et al. 2014).

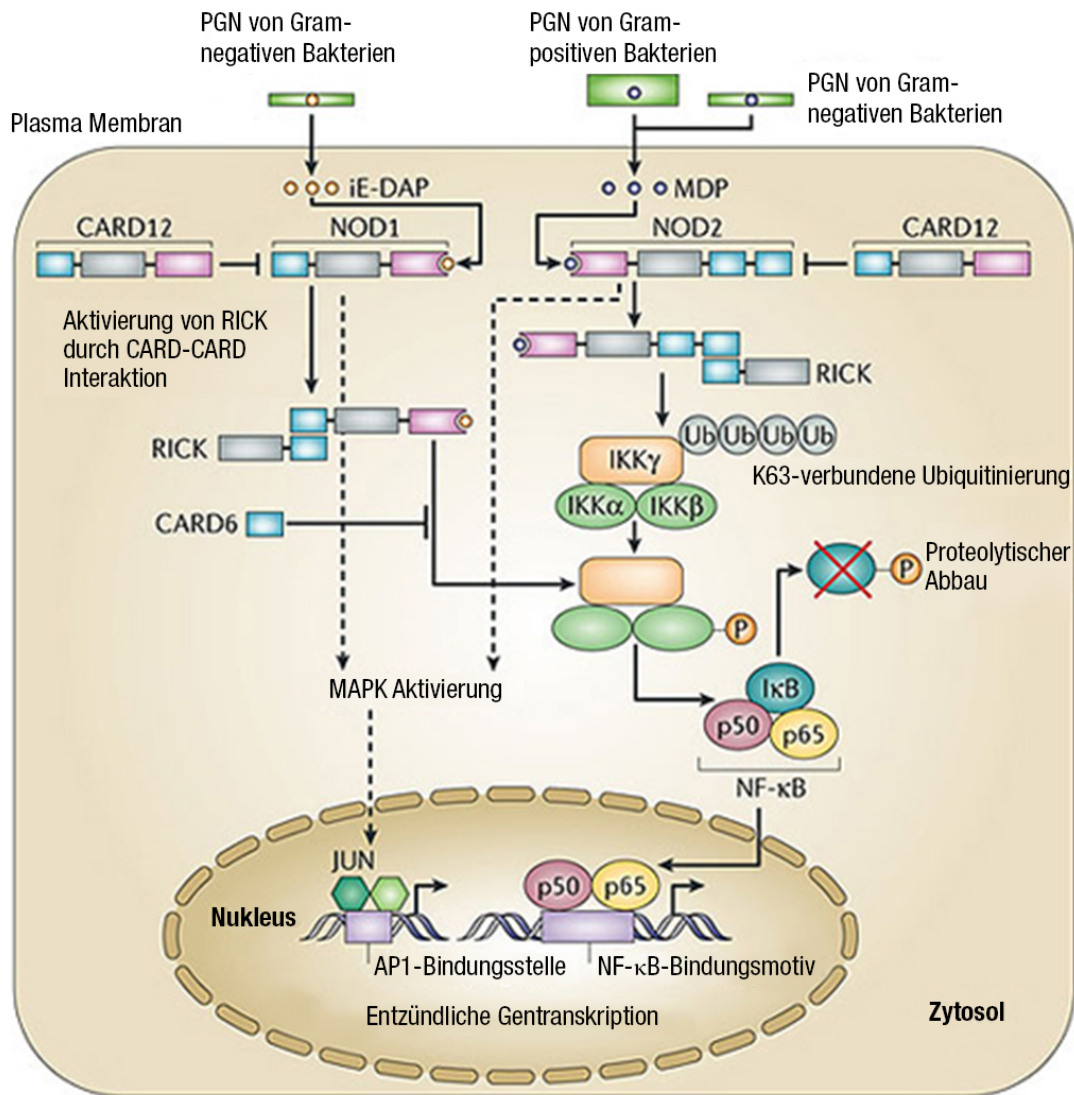
## 2.5.2 Chromosom 16

Auch die beiden Polymorphismen auf Chromosom 16, rs2066845 und rs2066844, spielen eine Rolle bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und liegen in Genen des Immunsystems, wodurch sie auch in Bezug auf die chronische Parodontitis als möglicher Einflussfaktor in Frage kommen.

### 2.5.2.1 Polymorphismus rs2066845 und

### 2.5.2.2 Polymorphismus rs2066844

Die Polymorphismen rs2066845 und rs2066844 finden sich auf Chromosom 16 (16q12.1) des *NOD2(G908R)*-Rezeptors (*Nukleotid-bindende Oligomerisationsdomäne* 2). Intrazelluläre NOD-Rezeptoren erkennen Peptidoglykanfragmente der bakteriellen Zellwand (NOD 1) oder Muramyl-dipeptid (NOD 2), ein Grundbaustein zahlreicher Bakterien einschließlich parodontalpathogener Keime. NOD Rezeptoren gehören zur Familie der Nod-like receptors (NLR), welche das Inflammasom stimulieren, das die Freisetzung von biologisch aktivem IL-1 aus einem inaktiven Vorläufer vermittelt. Lokalisiert sind sie im Zytosol der Zelle und erkennen somit molekulare Muster von Erregern, die in die Zelle eingedrungen sind (Suermann et al. 2012, Girardin et al. 2003, Okugawa et al. 2010). Ogura et al. postulierten 2001, dass NOD2 als intrazellulärer Rezeptor für bakterielle Produkte in Monozyten dient und Signale umwandelt, welche zu NF- $\kappa$ B Aktivierung führen. NOD2 ist bei Monozyten bzw. Makrophagen nachweisbar und unterscheidet sich durch zwei N-terminale CARD Regionen von NOD1. Zentral liegt eine Nukleotidbindende Region mit P-Loop und C-terminal eine leucinreiche Domäne. NOD2 benötigt beide CARD Regionen um NF- $\kappa$ B zu aktivieren (Abbildung 4).



Copyright © 2005 Nature Publishing Group  
Nature Reviews | Immunology

Abbildung 4: Signalwege von NOD1 und NOD2. Erkennung von Muramyl-Dipeptid (MDP) und  $\gamma$ -D-glutamyl-meso-diaminopimelic Acid (iE-DAP) durch die leucinreiche Repeat Domäne (LRR) aktiviert die NOD (nukleotid-bindende Oligomerisationsdomäne) Proteine NOD1 und NOD2, wodurch Rezeptor-interagierende serine/threonine Kinase (RICK) durch caspase-recruitment Domäne (CARD)-CARD Interaktionen rekrutiert wird. Bei NOD2 führt die Aktivierung von RICK zu K63 (Lys63)-verbundenen Polyubiquitylation von IKK $\gamma$  (IkB Kinase gamma). Es folgt die Phosphorylierung von IKK $\beta$  (IkB Kinase beta) und IkB sowie die Freisetzung von NF- $\kappa$ B für die Translokation in den Zellkern (Stober et al. 2006). AP1: Aktivator Protein 1, PGN: Peptidoglykan (Bildquelle Strober et al. 2006).

Ogura et al. (2001) und Hugot et al. (2001) identifizierten Mutationen im NOD2-Gen, die mit dem Erkrankungsrisiko für *Morbus Crohn* assoziiert sind (Ogura et al. 2001, Hugot et al. 2001). Girardin et al. zeigen 2003, dass NOD2 Muramyl-dipeptid (MDP) erkennt, das minimal bioaktive Peptidoglykanmotiv, welches sowohl in gram-negativen als auch gram-positiven Bakterien vorkommt. Dies hilft, die Ätiologie von *Morbus*

*Crohn* in Zusammenhang mit der Interaktion zwischen Wirt und Bakterien besser zu verstehen (Girardin et al. 2003).

Der Prozess, der bei der Parodontitis zum Gewebeuntergang führt, wird unter anderem durch spezifische immunologische Faktoren, wie proinflammatorische Zytokine (IL-1, IL-6 TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) vermittelt (Graves et al. 2000). Proinflammatorische Zytokine werden ebenfalls durch Rezeptoren der NOD Familie gesteuert (Inohara et al. 2001). Einige Beweise für die Wichtigkeit der Rolle von NOD2 bezüglich der Wechselwirkung zwischen Wirt und Bakterien, die Epithelzellen invadieren, liefern Studien über die Darmschleimhaut (Rubino et al. 2012). Auch bei der Darmerkrankung *Morbus Crohn* spielt die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen (IL-1- $\beta$ , IL-6, IL-12 und TNF) durch Epithelzellen, dendritische Zellen und Makrophagen eine Rolle. Daraufhin kommt es zu einer TH-17 und TH-1 vermittelten Immunantwort und Ausschüttung von IL-17, was wiederum dazu beiträgt, dass neutrophile Granulozyten die Darmmukosa infiltrieren und durch Ausschüttung verschiedener Mediatoren zu Gewebezerstörung führen (de Souza et al. 2016). Ähnliche Bedingungen finden sich bei der Erkrankung der chronischen Parodontitis, bei der es über IL-17 und RANKL (*receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand*) zu Gewebezerstörung in Form von Knochenabbau kommt (Lin et al. 2015). NOD1 und NOD2 werden neben TLRs von oralen und parodontalen Endothelzellen exprimiert (Uehara et al. 2008). Wie bei den Darmerkrankungen *Morbus Crohn* und *Colitis ulcerosa* kommt es auch bei der chronischen Parodontitis zur Invasion der Epithelzellen durch Bakterien, wie beispielsweise durch *Porphyromonas gingivalis* (Amano et al. 2007). In einem Versuch von Okugawa et al. 2010 mit embryonalen Nierenzellen konnten Bakterien der Spezies *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und *Fusobacterium nucleatum* und ihre Peptidoglycane NOD1 und NOD2 stimulieren. Dies führte zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B, wobei die Reaktion auf *Porphyromonas gingivalis* am schwächsten war, was das bessere Überleben dieses Bakteriums in der parodontalen Tasche erklären könnte (Okugawa et al. 2010). NF- $\kappa$ B kann im Zellkern an ein bestimmtes DNA-Motiv binden und zur Transkription von Genen führen, die Entzündungsprozesse modulieren (Sen et al. 1986, Nichols et al. 2001).

### **3 Ziele der Studie**

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Assoziation von fünf funktionell wirksamen Einzelnukleotid-Polymorphismen auf Chromosom 9 (rs4986790, rs4263839, rs10758669) und Chromosom 16 (rs2066844, rs2066845) einer Bevölkerungsgruppe süddeutscher Abstammung mit der klinischen Manifestation der chronischen Parodontitis. Neben der Analyse der Einzelnukleotid-Polymorphismen sollte zusätzlich eine Kopplungs- und Haplotypanalyse erfolgen.

## **4 Material und Methode**

### **4.1 Studienpopulation**

Bei den Teilnehmern der Studie handelte es sich um erwachsene Personen mit kaukasisch genetischem Hintergrund. Dies gilt sowohl für die Gruppe der an Parodontitis erkrankten Menschen als auch für die gesunde Kontrollgruppe. Alle Teilnehmer sind deutscher Abstammung. Patienten, die an Osteoporose, HIV oder Diabetes mellitus leiden, wurden von der Studie ausgeschlossen, ebenso schwangere Frauen. Alle Studienteilnehmer gaben, nachdem sie über Ablauf und Ziele der Studie informiert wurden, ihre schriftliche Einverständniserklärung zur Teilnahme an diesem Projekt. Bewilligt wurde die Studie durch die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität (290/01).

#### **4.1.1 Klinische Untersuchungen**

Die Angaben zur Abstammung, zu Vorerkrankungen, Medikamenteneinnahme, Alter, Geschlecht und Rauchverhalten wurden mittels Fragebogen erhoben. Klinisch wurde an sechs Punkten eines jeden Zahnes eine Messung der Taschensondierungstiefe durchgeführt. Kam es dabei zur Blutung, wurde dies ebenfalls in den Befund unter dem Index BOP (bleeding on probing) aufgenommen. Erhoben wurden die Messwerte mit Hilfe einer Parodontalsonde PCP 10 (Hu-Friedy Europe, Leimen, Deutschland), jeweils mesiobukkal, zentrobukkal, distobukkal, mesiopalatinal, zentropalatinal und distopalatinal der Zahnachse folgend vom Gingivalsaum bis zum Sulkusboden. Vom Eingang der Furkation bei Molaren und ersten Prämolaren im Oberkiefer bis zum Boden des Defektes wurde in horizontaler Richtung mit einer Naber Sonde Typ PQ2N (Hu-Friedy Europe, Leimen, Deutschland) der Befall der Furkation gemessen und anhand der Klassifikation von Hamp et al. 1975 eingeteilt. Grad I entspricht einem horizontalen Attachmentverlust von 3 mm, Grad II einem Verlust von über 3 mm wobei die Furkation nicht durchgängig ist und Grad III einer durchgängig sondierbaren Furkation.

Die Lockerung der Zähne wurde eingeteilt in Grad I (die Zahnkrone ist bis zu 1mm auslenkbar), Grad II (die Zahnkrone ist über 1 mm auslenkbar) und Grad III (der Zahn ist auf Wangen- bzw. Zungendruck oder vertikal auslenkbar). Röntgenologisch wurde

mittels Orthopantomogramm das Ausmaß des Attachmentverlust anhand des horizontalen und vertikalen Knochenabbaus abgeschätzt.

#### 4.1.2 Patientengruppe mit Parodontitis

Alle Teilnehmer der Gruppe der an Parodontitis erkrankten Personen befanden sich in klinischer Behandlung an der Ludwig-Maximilians-Universität München in der Abteilung für Zahnerhaltung und Parodontologie. Die Diagnose einer ‚chronischen Parodontitis‘ wurde bei den Patienten an Hand von standardisierten Kriterien gestellt. Um in die Untersuchungsgruppe der Studie aufgenommen zu werden, mussten die Zeichen einer generalisierten Form der chronischen Parodontitis bei den Patienten festgestellt werden. Die Personen mussten einen Gebissstatus von mindestens 15 Zähne in situ, an wenigstens 8 Zähnen eine Taschensondierungstiefe von größer oder gleich 5 mm oder einen Furkationsbefall von Klasse II-III aufweisen. Als Alternative musste an betroffenen Zähnen radiologisch ein Knochenabbau von größer oder gleich 3 mm zwischen Schmelz-Zement-Grenze und Limbus alveolaris sichtbar sein.

#### 4.1.3. Kontrollgruppe ohne Parodontitis

Die Personen der Kontrollgruppe hatten mindestens 22 Zähne in situ und wiesen weder klinische noch radiologische (soweit eine Panoramaschichtaufnahme zur Verfügung stand) Anzeichen für Knochenabbau, wie Furkationsbefall, eine Taschensondierungstiefe an einer Messstelle von über 3 mm oder Rezessionen auf. Sie wurden in den letzten 5 Jahren nicht wegen einer Parodontitis behandelt. Die Teilnehmer waren nicht miteinander verwandt und ebenfalls kaukasischer Abstammung. Sie wurden zufällig aus der Münchner Bevölkerung ausgewählt.

### 4.2 Beschreibung der Methoden und des verwendeten Materials

#### 4.2.1 Blutentnahme

Allen Probanden wurde mit sterilen Röhrchen (Monovette®, Sarstedt, Nümbrecht) 9 ml venöses Blut aus der Armbeuge (Fossa cubitalis) entnommen. Die Röhrchen enthielten 1,6 mg Kalium-EDTA-Lösung pro ml Blut. Um das Blut gleichmäßig in Kontakt mit der im Röhrchen enthaltenen Lösung zu bringen, wurden diese geschwenkt. Die gewonnenen Proben wurden innerhalb von 24 Stunden weiterverarbeitet.

#### 4.2.2 Aufbereitung und Lagerung der Blutproben

Die Blutproben wurden zehn Minuten lang bei 2000 U/min zentrifugiert, wobei sich Plasma absetzte, das anschließend entfernt wurde.

Die Blutproben wurden danach auf zwei verschiedene Arten weiterverarbeitet:

a) Der Buffy-coat, bestehend aus Leukozyten und Thrombozyten, konnte abpipetiert werden, da er sich durch die Zentrifugation auf dem Erythrozytensediment abgesetzt hatte. Er wurde in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gefüllt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert.

b) Bei der zweiten Art der Weiterverarbeitung wurde der Buffy-coat zusammen mit dem Erythrozytensediment in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit Erythrozytenlysepuffer, der aus 155 mM NH<sub>4</sub>Cl, 400 mM NaCl und 1 mM EDTA (Apotheke, Klinikum der Universität München) besteht, auf 12 ml aufgefüllt. Nach einer Inkubationszeit von zehn bis dreißig Minuten bei Raumtemperatur gingen die Erythrozyten in Lyse. Die klare Flüssigkeit wurde mit 2000 U/min für 10 min zentrifugiert, wobei sich ein Leukozytensediment absetzte. Der Überstand wurde verworfen und dem Sediment 3 ml Erythrozytenlysepuffer zugegeben, um anschließend weitere fünf Minuten bei gleicher Umdrehungszahl zentrifugiert zu werden. Nach Entsorgung des Überstandes wurde das Leukozytensediment in 1 ml Erythrozytenlysepuffer resuspendiert und weitere fünf Minuten bei 5000 U/min mittels Tischzentrifuge (Modell SD und AL, Roth) zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Leukozytensediment bei -20 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

#### 4.2.3 DNA-Isolierung

##### 4.2.3.1 Verwendung des QIAamp® Blood MidiKit (Qiagen)

200 µl Proteinkinase K (20 mg/ml Qiagen) wurden in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen gegeben und mit 2 ml aufgetautem Buffycoat und 2,4 ml Puffer AL (10 mM Tris/HCl pH 8, 400 mM NaCl, 10 mM EDTA, Apotheke Klinikum der Universität München) auf einem Vortex-Rüttler (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) vermengt.

Die Lösung wurde zunächst bei 70 °C im Wasserbad für zehn Minuten inkubiert, anschließend wurde ihr 2 ml absoluter Ethanol (100%, Merck) zugegeben. Das Lysat wurde wieder auf dem Vortex-Rüttler vermischt. Dann wurden 3 ml dieser Lösung auf die vorgesehene Säule (QIAamp midi column, Qiagen) übertragen und bei 1850 U/min



für 3 Minuten zentrifugiert. Das Filtrat wurde entfernt und verworfen, der Rest des Lysates auf gleiche Art aufgeladen, zentrifugiert und das Filtrat wieder verworfen. In zwei Schritten erfolgte dann die Waschung, zuerst durch Aufbringen von 2 ml AW1 Puffer (Qiagen Nr. 19081) auf die Säule und anschließender Zentrifugation für 15 Minuten bei 5000 U/min und Verwerfen des Überstandes, dann durch Auftragen von 2 Mal AW2 Puffer (Qiagen Nr.19072). Die durch dieses Verfahren isolierte DNA wurde bei -20°C gelagert.

#### 4.2.3.2 Verwendung der Aussalzmethode

Für die Aussalzmethode nach *Miller* 1988 wurde das aus dem Blut isolierte Leukozytensediment verwendet, welches in ein Zentrifugenröhrchen mit Spitzboden gefüllt und mit 5 ml Kernlysepuffer (NH<sub>4</sub>Cl, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA) versetzt wurde. Dieses Gemisch wurde auf- und abpipetiert und auf dem Vortex-Rüttler vermischt. Es wurde SDS (Natriumdodecylsulfat-Lösung 20% Qiagen, Hilden, Deutschland) in einer Endkonzentration von 1% zugegeben, wodurch der Zellkern aufgelöst und die DNA freigesetzt wurde. Inkubiert wurde diese Lösung für einige Stunden nach Zugabe von 150 µl Proteinkinase K (Qiagen, Hilden, Deutschland) mit einer Endkonzentration von 0,2 mg/ml bei 37°C, wobei sie währenddessen mehrmals auf dem Vortex-Rüttler vermischt wurde, um die Entstehung eines zähen und gelartigen Endproduktes zu verhindern. Um die DNA in vollständig gelöster Form zu erhalten, wurde, falls nötig, die Inkubationszeit verlängert oder zusätzlich Kernlysepuffer zugegeben. Ein Drittel Volumen 5M NaCl-Lösung wurde zugegeben und bei 4°C für mindestens 30 Minuten nach vorangegangener Durchmischung inkubiert, um die Membran- und Proteinfragmente möglichst vollständig auszufällen. Durch anschließende Zentrifugation bei 3000 U/min setzte sich ein Proteinsediment ab, von dem der Überstand abpipetiert werden konnte, um ihn nochmals bei gleicher Umdrehungszahl zu zentrifugieren. Dieser Überstand wurde mit 0,6 ml Isopropanol (Merck) langsam vermengt. Die DNA, welche fadenförmig ausfiel, wurde mit einer automatischen Pipette aufgenommen und in 70%igem Ethanol (Merck) in zwei Durchgängen gereinigt. Nach ihrer Trocknung wurde die DNA mengenabhängig in 50-300 µl bidestilliertem, sterilen Wasser gelöst und bei -20°C gelagert.

#### 4.2.4 Bestimmung der Nukleinsäurenkonzentration

Bei einer Wellenlänge von 260 nm wurde in einem Photometer (Modell Gene Quant Pro RNA/DNA Calculator® von Amersham Pharmacia) die DNA-Konzentration gemessen. Mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes wurde die Konzentration ermittelt und die Proben anschließend zu einer Endkonzentration von 100 ng/μl verdünnt.

#### 4.2.5 Genotypisierung via MALDI-TOF (matrix assisted laser desorption/ionisation time of flight mass spectrometry)

Die Proben der genomischen DNA wurden zu einer Zielkonzentration von 50 ng/μl verdünnt. Das Zielvolumen betrug 100 μl, das maximale Volumen 200 μl, wobei alle Proben, unabhängig von der verfügbaren DNA Menge, ein einheitliches Volumen haben sollten, um einen DNA Verlust zu vermeiden. Die minimale DNA-Menge betrug 0,4 μg absolut. Als Puffer zur Verdünnung wurde TEE-Puffer oder DNA Hydration Lösung (Qiagen) verwendet. Die erworbenen DNA-Proben wurden auf 96-well-Platten (ABgene Thermo-Fast 96 PCR Platte Skirted: Nr. AB-0800) pipettiert.

Die 96-well Platten (ABgene Thermo-Fast 96 PCR Plate Skirted, Nr. AB-0800) wurden mit nur 92 Proben bestückt, wobei zwei Positionen für Negativkontrollen leer blieben. Die Positionen D05 und E07 konnten ebenfalls für Negativkontrollen verwendet werden und blieben leer. Die Platten wurden, nachdem sie mit Folie (ABgene Adhesive PCR-Film Nr. AB-0558) verschlossen wurden, bei 4°C gelagert. Für jede Platte wurde ein Datenfile (Excel) angelegt, in der Projektname, Position auf der Platte, Probennummer, Volumen der Probe und DNA-Konzentration vermerkt wurden.

In Kooperation mit dem Helmholtz Forschungszentrum München (Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt, Institut für Epidemiologie, Dr. Norman Klopp) erfolgte die Genotypisierung der Proben via MALDI-TOF.

Genotypisiert wurde mit einem MALDI TOF MS System (Sequenom, Hamburg, San Diego). Zuerst wurde eine PCR auf Tetard Multi Cyclers-Blöcken der Firma MJ Research (Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf, D) durchgeführt. 10% der PCR-Produkte wurden auf 3% Agarosegelen überprüft. Mit dem Enzym SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) wurden nach der PCR-Reaktion die nicht eingebauten Nukleotide inaktiviert. Das Enzym wurde automatisiert mittels Roboter der Firma Beckman Coulter GmbH (Krefeld D) pipettiert. Anschließend folgte eine Primer Extensionsreaktion, wofür ein weiterer, sogenannter Extensionsprimer derart designed

wurde, dass er direkt vor dem zu untersuchenden SNP an das PCR-Produkt band. Die Reaktion selbst wurde mit drei Didesoxynukleotiden und einem Desoxynukleotid durchgeführt, wodurch jeder Extensionsprimer um eine oder zwei Basen verlängert wurde und so allelspezifisch, durch die Länge unterscheidbare DNA Fragmente, entstanden.

Roboter (Firma Beckman Coulter GmbH (Kefeld, D)) pipettierten das Liquidhandling der SAP Reaktion und der Primerextension und PCR-Maschinen führten die Reaktion durch. Kationen, die die MALDI-TOF-Messung gestört hätten, wurden durch Zugabe eines Inonenaustauschharzes (SpectroClean<sup>TM</sup> Sequenom, Hamburg, D) entfernt. Mit dem Spectro Point Nanoliter Pipetting Systems<sup>TM</sup> der Firma Sequenom (Hamburg) wurden 1-2 nl der Lösung auf Siliziumchips pipettiert, auf denen sich 384 Matrixspots befanden, die mit 3-Hydroxypicolinsäure beladen waren. Darauf wurden die zu analysierenden Proben gespottet. Außerdem wurden Oligonukleotide bekannter Masse (Kalibraten), die zur Kalibrierung des Analysesystems dienten, aufgebracht.

Bis zu zehn der mit den zu analysierenden Proben bestückten Chips wurden bei der matrixunterstützten Laser Desorption/Ionisation (MALDI Technik) durch eine Vakuumschleuse in das Massenspektrometer eingebracht und mit einem 100-1000-fachen Überschuss an 3-HPA Matrix versetzt, wodurch die Proben co-kristallisierten. Sie wurden dann einem intensiven Laserpuls von wenigen Nanosekunden Dauer im Hochvakuum ausgesetzt. Durch die Matrix wurde die Laserenergie absorbiert und somit die Ionisierung der Analyten gefördert und die photolytische Beschädigung der Proben, sowie die Interaktion der Analytenmoleküle untereinander verhindert. Im Desorptions-/Ionisationsvorgang wurden einfach geladene Moleküle erzeugt. Sie nahmen einen gasförmigen Zustand an. Diese Ionen wurden dann im elektrischen Feld auf gleiches Potenzial beschleunigt und in Abhängigkeit vom Masse-/Ladungsverhältnis ( $m/z$ ) nach verlassen der Ionenquelle im Flugrohr aufgetrennt, wobei Ionen mit niedrigen  $m/z$  Werten früher am Detektor eintrafen, als diejenigen mit hohen  $m/z$  Werten. Diese elektronische Messung der Zeit zwischen Start und Eintreffen der Ionen wurde im MALDI-TOF MS Gerät (Sequenom, San Diego, USA) durchgeführt. Die Software dieses Gerätes konnte die unterschiedlichen DNA Fragmente einem spezifischen Genotyp zuordnen, da die Fragmente ihrer Flugzeit entsprechend der Größe nach unterscheidbar waren. Nachdem die Ergebnisse abgespeichert wurden, wurde die Genotypisierungsmethode auf ihre Validität hin getestet (Hardy-Weinberg-

Gleichgewicht, Positivkontrollen, Negativkontrollen, Übereinstimmung doppelter Proben) (Illig et al. 2004).

### 4.3 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse wurden mit den zu erwartenden Häufigkeiten bei Vorliegen eines Hardy-Weinberg-Gleichgewichtes verglichen, um eine Populationsstratifikation auszuschließen. Die statistische Berechnung zur Assoziation der untersuchten SNPs mit der Parodontitis erfolgte mit Hilfe des Fishers-Exakt-Test (Allele) bzw. des Chi-Quadrat-Tests (Genotypen). Hierfür wurde zur statistischen Auswertung PASW (Version 18) verwendet. Die Assoziationsanalyse für die einzelnen SNPs sowie die Kopplungs- bzw. Haplotypanalyse wurden mit dem Programm SNPStats (<http://bioinfo.iconcologia.net/index.php?module=Snpstats>) durchgeführt. Die Odds ratios (OR) wurden mit einem Konfidenzintervall von 95% errechnet. Weiterhin wurde das Informationskriterium, konkret das Informationskriterium nach Akaike (=AIC) betrachtet. Es beschreibt durch einen Zahlenwert die Güte der Anpassung unterschiedlicher statistischer Modelle (Regressionsmodelle) an die Verteilung von tatsächlich beobachteten Merkmalen (Akaike, H. et al. 1973). Die Einflüsse von Alter, Geschlecht und Rauchen auf die Ergebnisse wurden durch multinominale logistische Regression errechnet. Auf alle errechneten p-Werte wurde die Bonferroni-Korrektur für multiples Testen angewendet.

#### 4.3.1 Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Das Hardy-Weinberg-Gesetz besagt, dass die Genhäufigkeiten von Generation zu Generation konstant bleiben. Dominante und rezessive Allele stehen bei ausreichend großer Population, bei freier Partnerwahl und Paarung aller Mitglieder einer Ausgangspopulation im Gleichgewicht.

Ist die Häufigkeit des Allels A  $p$  und die des Allels a  $q$  dann gilt:

$(p+q)^2 = 1$ . Die Gesamthäufigkeit der Allele an diesem Genort wird durch diese Formel benannt (Buselmaier et al. 2007).

Berechnet wurde die zu erwartende Frequenz für den Genotyp AA mit  $F_{AA} = p^2$ , für den Genotyp AB mit  $F_{AB} = 2 \times p \times q$  und für den Genotyp BB mit  $F_{BB} = q^2$ , wobei  $f$  für die tatsächlich beobachtete Häufigkeit steht. Die Signifikanzberechnung erfolgte nach der Formel:

$$\chi^2 = \frac{(\text{beobachtete Frequenz} - \text{erwartete Frequenz})^2}{(\text{beobachtete Frequenz})}$$

Als signifikant galten dabei Chi-Quadrat-Werte unter 6,64. Diese entsprechen p-Werten unter 0,054. Durch die angewendete Patienten-Selektion kann es in der Gruppe der Patienten zu Stichproben-Stratifizierung kommen. Deswegen wird nur die Kontrollgruppe auf Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht untersucht.

#### 4.3.2 Chi-Quadrat-Test (Mehrfelder-Test)

Der Chi-Quadrat-Test wurde zur Verteilungsanalyse der Genotypfrequenzen herangezogen.

Die Signifikanz wurde mittels des Chi Quadrat Tests wie folgt berechnet:

$$\chi^2 = N \times \frac{(a \times d - b \times c - \frac{N}{2})^2}{(a + b)}$$

	erkrankt	gesund	erkrankt und gesund
Merkmal z	a	c	a + c
Merkmal y	b	d	b+ d
Merkmal z und y	a+b	c+d	a + b+ c + d (=N)

Tabelle 1: Tabelle zur Berechnung des Chi-Quadrat-Tests

Chi-Quadrat-Werte < 6,64 wurden als signifikant betrachtet. Sie entsprechen p-Werten unter 0,054.

#### 4.3.3 Fisher's-Exact Test (Vier-Felder-Test)

Der Exakte Fisher-Test prüft die Signifikanz auf Unabhängigkeit in der Kontingenztafel. Für die Verteilungsanalyse der Allelfrequenzen, wurde der Fisher's Exact Test angewandt ( $\leq 4$  Felder).

#### 4.3.4 Quotenverhältnis (OR)

Das Quotenverhältnis oder auch Odds-Ratio beschreibt die Stärke des Zusammenhangs zweier Merkmale. Es kann angewendet werden um abzuschätzen, wie stark ein möglicher Risikofaktor mit einer Erkrankung in Zusammenhang steht und um eine Aussage darüber zu treffen, wie viel höher die Wahrscheinlichkeit zu erkranken ist, wenn man der Risikogruppe angehört, im Gegensatz zu der Gruppe ohne Risikofaktor. Ist die OR größer als 1, ist die Chance zu erkranken größer. Ist der Wert kleiner als 1, ist die Wahrscheinlichkeit zu erkranken geringer. Ist der Wert genau 1, ist die Chance zu erkranken in den beiden Gruppen gleich groß (Fahrmeir et al. 2011). In dieser Studie wurde ein Konfidenzintervall von 95% festgelegt.

#### 4.3.5 Bonferroni-Korrektur für multiples Testen

Die Wahrscheinlichkeit, dass eine Hypothese fehlerhaft als zutreffend angenommen wird, ist umso größer je mehr Hypothesen getestet werden.

Die Bonferroni-Korrektur kann zur Vermeidung der Überschreitung einer Fehlerwahrscheinlichkeit angewendet werden (Fahrmeir et al. 2011). Das korrigierte Signifikanzniveau wurde in dieser Studie für 5 Polymorphismen auf 0,01 festgelegt. Diese Korrektur wurde auch auf die signifikanten p-Werte der Haplotypberechnung angewendet, um das Problem des multiplen Testens auszuschließen. Um dies zu erreichen, wird davon ausgegangen, dass das Signifikanzniveau eines Einzeltests ein Anteil der globalen Signifikanz pro Test ist. Das korrigierte Signifikanzniveau in dieser Studie betrug nach Anwendung der Bonferroni-Korrektur 0,006 für 8 Haplotypen auf Chromosom 9 und 0,013 für 4 Haplotypen auf Chromosom 16.

#### 4.3.6 AIC-Wert

Weiterhin wurde das Informationskriterium nach Akaike (=AIC) betrachtet. Es beschreibt durch einen Zahlenwert die Güte der Anpassung unterschiedlicher statistischer Modelle an die Verteilung von tatsächlich beobachteten Merkmalen (Akaike, H. et al. 1973).

In dieser Studie misst das AIC rechnerisch die Güte der Anpassung von statistischen Modellen, die den unterschiedlichen Möglichkeiten der Vererbung (rezessiv, dominant, überdominant, codominant, log-additiv) entsprechen, an die beobachtete Verteilung der Genotypen in den beiden Studiengruppen (Kontrollen und PA-Gruppe). Das

Informationskriterium nach Akaike zeigt also an, welches der gerechneten statischen Modelle zu den jeweiligen Daten am besten passt. Der jeweils kleinste AIC-Wert beschreibt das wahrscheinlichste Vererbungsmuster (rezessiv, dominant, überdominant, codominant, log-additiv).

#### 4.3.7 Multinominale logistische Regression

Für diese multivariate Analyse, welche zur Kalkulation des sich möglicherweise auswirkenden Einflusses der Variablen Alter, Geschlecht und Rauchverhalten dient, wurde das Programm SPSS 19.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) verwendet. Berechnet wurde die Differenz der 2 Log-Likelihoods zwischen einem endgültigen und einem reduzierten Modell. Das reduzierte Modell zeichnet sich dadurch aus, dass ein Faktor aus dem endgültigen Modell weggelassen wurde. Dennoch zeigte sich eine Äquivalenz zwischen dem reduzierten und dem endgültigen Modell. Dies erklärt sich dadurch, dass das Weglassen dieses Faktors die Freiheitsgrade nicht erhöht.

#### 4.3.8 Kopplungsungleichgewichte und Haplotypanalyse

Das Kopplungsungleichgewicht und die Haplotypfrequenz wurde mit Hilfe des SNPStats Programms ([http://bioinfo.iconcologia.net/en/SNPStats\\_web](http://bioinfo.iconcologia.net/en/SNPStats_web)) bestimmt. Treten zwei Allele an unterschiedlichen Loci häufiger gemeinsam in der Population auf als aus der relativen Häufigkeit der einzelnen Allele zu erwarten wäre, befinden sich diese im Kopplungsungleichgewicht (Murken et al. 2011).

Es wird bestimmt durch Lewontins Disequilibriumskoeffizienten (D). Allel A kommt mit einer Häufigkeit von  $p_A$ , Allel B mit einer Häufigkeit von  $p_B$  vor. Kommen beide gleichzeitig vor, ist die Wahrscheinlichkeit  $p_{AB}$ .

D kann dann berechnet werden mit  $D_{AB} = p_{AB} - p_A p_B$  (Slatkin 2008).

Es ergeben sich ein  $D_{min}$ - und ein  $D_{max}$ -Wert, die jedoch von der Allelfrequenz abhängen und somit eine Interpretation schwierig machen. Eine weniger allelabhängige Maßzahl ist  $D' = D/D_{max}$  und  $r^2$  (Korrelationskoeffizient)  $= D^2 / (p_A p_a p_B p_b)$ . Es werden durch p die verschiedenen Allelfrequenzen für die jeweiligen Allele A, a, B und b ermittelt. Beträgt  $D'$  oder r gleich 1 oder nahezu gleich 1, dann kann man von einer Kopplung zwischen den zwei Loci ausgehen. Ist  $D'$  oder r gleich Null, liegt keine Kopplung vor. Um weitere Informationen über die Kandidatengene zu erhalten, sollten auch Haplotypen analysiert werden (Bickeböller 2007). Haplotypen sind Allele von eng gekoppelten Genorten, die häufig gemeinsam vererbt und nicht durch Crossover

getrennt werden (Murken et al. 2011). In dieser Studie wurde auf eine mögliche Assoziation der Haplotypen mit der Erkrankung der chronischen Parodontitis für die gesamte Studienpopulation und nach Adjustierung hinsichtlich des Alters, Geschlechts und Rauchverhaltens untersucht.

#### 4.3.9. Schätzung von Haplotypen

Die Bestimmung von Haplotypen aus multiplen Genotypen, d.h. Genotypen an mehreren Loci, wird geschätzt (Bickeböllner et al. 2007). Um Haplotypen zu rekonstruieren, werden statistische Methoden angewendet. Die Häufigkeiten für jeden Haplotyp werden mit Algorithmen, wie beispielsweise mit der Methode nach Clark oder mit dem Erwartung-Maximierungs-Algorithmus überschlagen (Stephens et al. 2001). Haplotypen sind eine Reihe von Allelen, die von einem Elternteil vererbt worden sind, d.h. auf denselben Chromatiden liegen. Sie treten bei jedem Individuum für jeweils zwei Chromosomenstränge doppelt auf, wobei nicht bekannt ist welches Allel auf welchem Chromosomenstrang liegt. Nur bei homozygoten SNPs ist das Allel gleich und die zwei Haplotypen sind somit zu erkennen. Bei heterozygoten SNPs dagegen können die Haplotypen nicht mehr exakt bestimmt und müssen geschätzt werden (Bickeböllner et al. 2007). Die Haplotypfrequenzen in dieser Studie wurden mittels SNPStats berechnet ([http://bioinfo.iconcologia.net/en/SNPStats\\_web](http://bioinfo.iconcologia.net/en/SNPStats_web)). Dabei wurde als Referenz-Haplotyp derjenige festgelegt, der am häufigsten vorkam. Die seltenen Haplotypen wurden gepoolt. Um die Schwelle für die seltenen Haplotypen festzusetzen wurden die kumulativen Frequenzen verwendet. Dann wurden Assoziationsanalysen für die verschiedenen Haplotypen durchgeführt (Solé et al. 2006).



## 5 Ergebnisse

### 5.1 Charakteristika der Studienpopulation

Die Studienpopulation setzte sich zusammen aus 939 Personen mit kaukasisch-genetischem Hintergrund und süddeutscher Abstammung. Von den Teilnehmern waren 352 (37,49%) an Parodontitis erkrankt und 587 (62,51%) gesund. In der Parodontitisgruppe lag das durchschnittliche Alter bei 52,3 (+/- 14,5) Jahren in der Kontrollgruppe bei 47,1 (+/-9,8) Jahren. Die Altersspanne betrug in der Parodontitisgruppe 18-84 Jahre, in der Kontrollgruppe 35-68 Jahre. 371 Studienteilnehmer waren weiblich, 540 männlich. 153 Männer waren an Parodontitis erkrankt, 387 Männer waren gesund. In der Gruppe der Frauen waren 196 Teilnehmerinnen gesund und 175 an Parodontitis erkrankt. 142 Studienteilnehmer wurden der Gruppe der Raucher zugeordnet, wovon 100 an chronischer Parodontitis litten und 42 nicht erkrankt waren. Bei einigen Studienteilnehmern fehlen die demographischen Angaben zum Geschlecht oder zum Rauchverhalten (Tabelle 2).

	Parodontitisgruppe	Kontrollgruppe
Anzahl	352 (37,49%)	587 (62,51%)
Frauen	175 (49,71%)	196 (33,39%)
Männer	153 (43,47%)	387 (65,93%)
Geschlecht unbekannt	24 (6,81%)	4 (0,68%)
Raucher	100 (28,4%)	42 (7,16%)
Nichtraucher	210 (59,66%)	306 (52,13%)
Rauchverhalten unbekannt	42 (11,32%)	239 (40,81%)
Altersspanne	18-84	35-68
Altersdurchschnitt	52,4 (+/-14,5)	47,1 (+/-9,8)

Tabelle 2: Merkmale der Studienpopulation

## 5.2 Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Die Genotypverteilungen für alle getesteten SNPs waren im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (Tabelle 3-7).

### 5.2.1 Polymorphismen auf Chromosom 9

#### 5.2.1.1 Polymorphismus rs4986790

Anteil der genotypisierten Individuen: 915/939 (97,44%)

	N11	N12	N22	N1	N2	P-Wert
Beide	806	107	2	1719	11	0,77
Parodontitis	306	39	0	39	39	0,61
Kontrolle	500	68	2	72	72	1,00

Tabelle 3: rs498670 Exakter Test für Hardy-Weinberg- Gleichgewicht (n=915)

Die Kontrollgruppe des SNP rs498670 befand sich im Hardy-Weinberg Gleichgewicht.

#### 5.2.1.2 Polymorphismus rs 4263839

Anteil der genotypisierten Individuen: 907/939 (96,59%)

	N11	N12	N22	N1	N2	P-Wert
Beide	410	403	94	1223	591	0,76
Parodontitis	144	161	39	449	239	0,63
Kontrolle	266	242	55	7774	352	1,00

Tabelle 4: rs4263839 Exakter Test für Hardy-Weinberg- Gleichgewicht (n=907)

Auch für rs4263839 kann ein systematischer Fehler bei Zusammenstellung der Studienpopulation ausgeschlossen werden, da sich die Kontrollgruppe im Hardy-Weinberg Gleichgewicht befand.

### 5.2.1.3 Polymorphismus rs10758669

Anteil der genotypisierten Individuen: 897/939 (95,53)

	N11	N12	N22	N1	N2	P-Wert
Beide	358	395	117	1165	629	0,34
Parodontitis	133	154	51	420	256	0,56
Kontrolle	252	241	66	745	373	0,51

Tabelle 5: rs10758669 Exakter Test für Hardy-Weinberg- Gleichgewicht (n=897)

Bei rs10758669 zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Verteilung der Kontrollgruppe zu der zu erwartenden Verteilung der Genotypen.

## 5.2.2 Polymorphismen auf Chromosom 16

### 5.2.2.1 Polymorphismus rs2066845

Anteil der genotypisierten Individuen: 726/939 (77,32%)

	N11	N12	N22	N1	N2	P-Wert
Beide	697	28	1	1422	30	0,26
Parodontitis	244	11	0	499	11	1
Kontrolle	453	17	1	923	19	0,17

Tabelle 6: rs2066845 Exakter Test für Hardy-Weinberg- Gleichgewicht (n=726)

Die Studienpopulation befand sich für rs2066845 im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

### 5.2.2.2 Polymorphismus rs2066844

Anteil der genotypisierten Individuen: 914/939 (97,34%)

	N11	N12	N22	N1	N2	P-Wert
Beide	838	71	5	1747	81	0,028
Parodontitis	318	24	3	660	30	0,02
Kontrolle	520	47	2	1087	51	0,31

Tabelle 7: rs2066844 Exakter Test für Hardy-Weinberg- Gleichgewicht (n=914)

Bei rs2066844 zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Genotypverteilung in der Parodontitisgruppe, nicht jedoch in der Kontrollgruppe.

### 5.3 Untersuchte Polymorphismen in der Studienpopulation

#### 5.3.1 Chromosom 9

##### 5.3.1.1 Polymorphismus rs4986790

Für den Polymorphismus rs4986790 ergaben sich drei mögliche Genotypen (AA, AG, GG). Von den insgesamt 939 Proben konnten 915 Proben typisiert werden. Somit ergab sich eine Anzahl typisierbarer Proben von 570 in der Kontrollgruppe und 345 in der Patientengruppe.

	Allelfrequenz		Genotypverteilung			Gesamt
	A	G(MA)	AA	AG	GG	
Patientengruppe	651 94,3%	39 5,7%	306 88,7%	39 11,3%	0 0%	345 100%
Kontrollgruppe	1068 93,7%	72 6,3%	500 87,7%	68 11,9%	2 0,4%	570 100%
Gesamt	1711 94%	111 6%	806 88,1%	107 11,7%	2 0,2%	915 100%
P-Wert	0,5645		0,521			

Tabelle 8: SNP rs4986790: Prozentuale Verteilung der Genotypen (2x4Felder Chi-Quadrat-Test) und der Allele A und G in der Studienpopulation sowie zugehörige p-Werte. MA: Minorallel

Das Wildtypallel A kommt mit der Häufigkeit von 93,7% in der Kontrollgruppe bzw. mit 94,3% in der Patientengruppe vor, das mutierte Allel G mit einer Häufigkeit von 6,3% bzw. 5,7%. Der Genotyp AA tritt sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der Patientengruppe mit 87,7% bzw. 88,7% am häufigsten auf.

Sowohl in der Allel- als auch in der Genotypfrequenz lässt sich somit kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollgruppe und Patientengruppe feststellen. Auch die

statistische Analyse der Allelverteilung ( $p=0,5645$ ) sowie der Genotypverteilung ( $p=0,521$ ) zeigt keine signifikanten Unterschiede.

Vererbungsmodell	unangepasst		angepasst	
	P-Wert	AIC	P-Wert	AIC
codominant	0,37	1216,6	0,48	733,8
dominant	0,66	1216,4	0,93	733,3
rezessiv	0,17	<b>1214,7</b>	0,23	<b>731,9</b>
überdominant	0,78	1216,5	0,81	733,2
log-additiv	0,56	1216,2	0,96	733,3

	AA	AG	GG
Patientengruppe	306	39	0
	88,7%	11,3%	0%
Kontrollgruppe	500	68	2
	87,7%	11,9%	0,35%

Tabelle 9: Mögliche Vererbungsmodelle und Genotypfrequenz des SNP rs4986790

Der AIC Wert (kleinster Wert unangepasst=1214,7) lässt ein rezessives Vererbungsmuster für diesen Polymorphismus am ehesten wahrscheinlich erscheinen. Auch nach Adjustierung der Analyse nach dem Alter, dem Geschlecht und dem Rauchverhalten ist dieses Vererbungsmodell am ehesten wahrscheinlich (AIC-Wert angepasst=731,9).

### 5.3.1.2 Polymorphismus rs4263839

Für den Polymorphismus rs4263839 ergaben sich die möglichen Genotypen GG, GA, AA. Von den insgesamt 939 getesteten Proben konnten 32 nicht typisiert werden, davon 8 in der Patientengruppe und 24 in der Kontrollgruppe.

	Allelfrequenz		Genotypverteilung			Gesamt
	G	A(MA)	GG	AG	AA	
Patientengruppe	449 65,3%	239 34,7%	144 41,9%	161 46,8%	39 11,3%	344 100%
Kontrollgruppe	774 68,7%	352 31,3%	266 47,2%	242 43,0%	55 9,8%	563 100%
Gesamt	1223 67,4%	591 32,6%	410 45,2%	403 44,4%	94 10,4%	907 100%
p-Wert	0,1254		0,276			

Tabelle 10: SNP rs4263839: Prozentuale Verteilung der Genotypen (2x4Felder Chi-Quadrat-Test) und der Allele G und A in der Studienpopulation sowie die zugehörigen p-Werte ,MA: Minorallel

Das Wildtypallel G kommt in der Patientengruppe mit einer Häufigkeit von 65,3%, in der Kontrollgruppe mit 68,7% vor. Der Genotyp AG kommt in der Patientengruppe mit 46,8% am häufigsten vor, in der Kontrollgruppe tritt dagegen der Genotyp GG mit 47,2% am häufigsten auf.

Die statistische Analyse für die Allelfrequenz ( $p=0,1254$ ) und die Genotypenverteilung ( $p=0,276$ ) weist keine signifikanten Unterschiede auf.

Vererbungsmodell	unangepasst		angepasst	
	P-Wert	AIC	P-Wert	AIC
codominant	0,28	1207,4	0,093	719,1
dominant	0,11	<b>1205,5</b>	0,036	<b>717,5</b>
rezessiv	0,45	1207,4	0,23	720,4
überdominant	0,26	1206,7	0,18	720,1
log-additiv	0,12	1205,6	0,032	<b>717,3</b>

	GG	GA	AA
Patientengruppe	144	161	39
	41,9%	46,8%	11,3%
Kontrollgruppe	266	242	55
	47,2%	43%	9,8%

Tabelle 11: Mögliche Vererbungsmodelle und Genotypfrequenz des SNP rs4263839

Nach dem kleinsten AIC-Kriterium scheint ein dominantes Vererbungsmodell am wahrscheinlichsten. Nach Adjustierung kommt am ehesten ein dominantes oder log-additives Vererbungsmodell in Frage.

### 5.3.1.3 Polymorphismus rs10758669

Für den Polymorphismus rs10758669 ergaben sich folgende Genotypen: AA, AC und CC. Von den Proben waren insgesamt 42 nicht typisierbar. Somit bestand die Kontrollgruppe aus 559 typisierbaren Proben die Patientengruppe aus 338 Proben.

	Allelfrequenz		Genotypverteilung			Gesamt
	A	C(MA)	AA	AC	CC	
Patientengruppe	420 62,1%	256 37,9%	133 39,3%	154 45,6%	51 15,1%	338 100%
Kontrollgruppe	745 66,6%	373 33,4%	252 45,1%	241 43,1%	66 11,8%	559 100%
Gesamt	1165 64,9%	629 35,1%	385 42,9%	396 44,0%	117 13,0%	897 100%
p-Wert	0,0527		0,162			

Tabelle 12: SNP rs10758669: Prozentuale Verteilung der Genotypen (2x4Felder Chi-Quadrat-Test) und der Allele A und C in der Studienpopulation sowie die zugehörigen p-Werte, MA: Minorallel

Das Wildtypallel A kommt in der Patientengruppe mit einer Häufigkeit von 62,1%, in der Kontrollgruppe mit einer Häufigkeit von 66,6% vor. In der Kontrollgruppe erscheint das mutierte Allel C mit einer Häufigkeit von 33,4% in der Patientengruppe mit 37,9%. In der Patientengruppe kommt das mutierte Allel C also häufiger vor. Der Genotyp AC kommt in der Patientengruppe (45,6%) am häufigsten vor, in der Kontrollgruppe tritt der Genotyp AA am häufigsten auf (45,1%).

Für diesen Polymorphismus gibt es nominell einen gerade noch signifikanten Unterschied in der Allelverteilung ( $p=0,0527$ ). Nach Bonferroni-Korrektur kann dieses Ergebnis nicht aufrechterhalten werden. In der Genotypenverteilung zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen Patientengruppe und Kontrollgruppe ( $p=0,162$ ).



Vererbungsmodell	unangepasst		angepasst	
	P-Wert	AIC	P-Wert	AIC
codominant	0,16	1190,9	0,49	720,3
dominant	0,092	<b>1189,7</b>	0,24	<b>718,3</b>
rezessiv	0,16	1190,5	0,78	719,3
überdominant	0,47	1192	0,32	718,7
log-additiv	0,057	<b>1188,9</b>	0,32	718,8

	AA	AC	CC
Patientengruppe	133	154	51
	39,3%	46%	15%
Kontrollgruppe	252	241	66
	45%	43,1%	11,8%

Tabelle 13: Mögliche Vererbungsmodelle und Genotypfrequenz des SNP rs10758669

Das AIC-Kriterium weist auch nach Adjustierung am ehesten auf eine dominante Vererbung hin.

### 5.3.2 Chromosom 16

#### 5.3.2.1 Polymorphismus rs2066845

Für den Polymorphismus rs2066845 sind CC, CG und GG die vorhandenen Genotypen. 213 von 939 Proben konnten nicht typisiert werden. Somit konnten für die Patientengruppe 255 Proben typisiert werden, für die Gruppe der gesunden Probanden 471.

	Allelfrequenz		Genotypverteilung			Gesamt
	G	C(MA)	GG	GC	CC	
Patientengruppe	499 97,8%	11 2,2%	244 95,7%	11 3,1%	0 0%	255 100%
Kontrollgruppe	923 97,9%	19 2,1%	453 96,2%	17 3,6%	1 0,2%	471 100%
Gesamt	1422 97,9%	30 2,1%	697 96,0%	28 3,9%	1 0,1%	726 100%
p-Wert	0,8581		0,684			

Tabelle 14: SNP rs2066845: Prozentuale Verteilung der Genotypen (2x4Felder Chi-Quadrat-Test) und Allele C und G in der Studienpopulation sowie die zugehörigen p-Werte, MA: Minorallel

Das mutierte Allel C kommt in der Patientengruppe mit einer Häufigkeit von 2,2% und in der Kontrollgruppe mit 2,1% vor. Auch die Verteilung des Wildtypallels G ist ähnlich häufig in beiden Gruppen (Patientengruppe 97,8%, Kontrollgruppe 97,9%). Der Unterschied zwischen den Gruppen bezogen auf die Allelverteilung erreicht das Signifikanzniveau nicht ( $p = 0,8581$ ).

Sowohl in der Patientengruppe (95,7%) als auch in der Kontrollgruppe (96,2%) kommt der Genotyp GG am häufigsten vor. Der Genotyp CG kommt in der Patientengruppe häufiger vor als in der Kontrollgruppe und der Genotyp CC kommt in der Kontrollgruppe (0,2%) nur selten, in der Patientengruppe gar nicht vor. Der Unterschied in der Genotypverteilung der beiden Gruppen ist nicht signifikant ( $p=0,684$ )

Vererbungsmodell	unangepasst		angepasst	
	P-Wert	AIC	P-Wert	AIC
codominant	0,58	946,1	0,37	1216,6
dominant	0,75	945,1	0,66	1216,4
rezessiv	0,35	<b>944,3</b>	0,17	<b>1214,7</b>
überdominant	0,64	945	0,78	1216,7
log-additiv	0,86	945,2	0,56	1205,6

	GG	GC	CC
Patientengruppe	244	11	0
	95,7%	4,3%	0%
Kontrollgruppe	453	17	1
	96,2%	3,6%	0,2%

Tabelle 15: Mögliche Vererbungsmodelle und Genotypfrequenz des SNP rs2066845

Sowohl adjustiert als auch nicht adjustiert sprechen die kleinsten AIC-Werte am ehesten für ein rezessives Vererbungsmuster. In der Gesamtpopulation sowie nach Korrektur der Population hinsichtlich Alter, Geschlecht und Rauchverhalten konnte keine signifikante Assoziation für die Vererbungsmodelle gefunden werden.

### 5.3.2.2 Polymorphismus rs2066844

Für den zweiten Polymorphismus auf Chromosom 16 (rs2066844) lassen sich die Genotypen CC, CT und TT finden. Es waren 25 Proben nicht typisierbar, davon 7 in der Patientengruppe und 18 in der Kontrollgruppe.

	Allelfrequenz		Genotypverteilung			Gesamt
	C	T(MA)	CC	CT	TT	
Patientengruppe	660 95,7%	30 4,3%	318 92,2%	24 7,0%	3 0,9%	345 100%
Kontrollgruppe	1087 95,5%	51 4,5%	520 91,4%	47 8,3%	2 0,4%	569 100%
Gesamt	1747 95,6%	81 4,4%	838 91,7%	71 7,8%	5 0,5%	914 100%
P-Wert	0,8929		0,463			

Tabelle 16: SNP rs2066844: Prozentuale Verteilung der Genotypen (2x4Felder Chi-Quadrat-Test) und der Allele C und T in der Studienpopulation sowie die zugehörigen p-Werte. MA: Minorallel

Das Wildtypallel C kommt in beiden Gruppen häufiger vor (95,7% Patientengruppe, 95,5% Kontrollgruppe) als das mutierte Allel T (4,3% Patientengruppe, 4,5% Kontrollgruppe). Sowohl in der Patientengruppe als auch in der Kontrollgruppe kommt der Genotyp CC am häufigsten vor. Zwischen Allelen ( $p=0,8929$ ) und Genotypen ( $p=0,463$ ) sind keine statistisch signifikanten Verteilungsunterschiede erkennbar.

Vererbungsmodell	unangepasst		angepasst	
	P-Wert	AIC	P-Wert	AIC
codominant	0,47	1216,1	0,3	958,1
dominant	0,68	1215,4	0,42	957,9
rezessiv	0,31	<b>1214,6</b>	0,27	<b>957,3</b>
überdominant	0,47	1215,1	0,26	<b>957,3</b>
log-additiv	0,9	1215,6	0,64	958,3

	CC	CT	TT
Patientengruppe	318	24	3
	92,2%	7%	0,8%
Kontrollgruppe	520	47	2
	91,4%	8,3%	0,4%

Tabelle 17: Mögliche Vererbungsmodelle und Genotypfrequenz des SNP rs2066844

Als mögliches Vererbungsmodell kommt nach den nicht adjustierten Werten am ehesten das rezessive Vererbungsmuster in Frage, nach der adjustierten Berechnung entweder das rezessive oder das überdominante Vererbungsmodell (kleinster AIC-Wert 957,3).

## 5.4 Allel- und Genotypverteilung in Abhängigkeit vom Geschlecht

Um geschlechtsspezifische Unterschiede in der Verteilung der Polymorphismen nachzuweisen wurden die Allel- und Genotypverteilung bei Männern und Frauen getrennt untersucht.

### 5.4.1 Vergleich mit den untersuchten Polymorphismen auf Chromosom 9

#### 5.4.1.1 Polymorphismus rs4986790

Sowohl bei den Männern als auch bei den Frauen beider Gruppen (Patientengruppe und Kontrollgruppe) kommt das Wildtypallel A und der Genotyp AA am häufigsten vor. Es liegt kein signifikanter Unterschied in der Allelverteilung in der Untergruppe der Frauen

( $p=0,7387$ ) als auch in der Subpopulation der Männer ( $p=0,2153$ ) vor. Die Genotypverteilung der Frauen ( $p=0,402$ ) und die der Männer ( $p=0,198$ ) lässt keinen signifikanten Unterschied zwischen Patienten- und Kontrollgruppe erkennen.

<b>Männer</b>	Allelfrequenz		Genotypverteilung			Gesamt
	A	G(MA)	AA	AG	GG	
Patientengruppe	287 95,7%	13 4,3%	137 91,3%	13 8,7%	0 0%	150 100%
Kontrollgruppe	697 93,7%	47 6,3%	325 87,4%	47 12,6%	0 0%	372 100%
Gesamt	984 94,3%	60 5,7%	462 88,5%	60 11,5%	0 0%	522 100%
P-Wert	0,2153		0,198			

Tabelle 18: SNP rs4986790: Prozentuale Verteilung der Genotypen (2x4Felder Chi-Quadrat-Test) und der Allele A und G in der Studienpopulation in Abhängigkeit vom Geschlecht (Männer) sowie die zugehörigen p-Werte MA: Minorallel

Frauen	Allelfrequenz		Genotypverteilung			Gesamt
	A	G(MA)	AA	AG	GG	
Patientengruppe	322	20	151	20	0	171
	94,2%	5,8%	88,3%	11,7%	0%	100%
Kontrollgruppe	363	25	171	21	2	194
	94%	6%	88,1%	10,8%	1%	100%
Gesamt	685	45	322	41	2	365
	93,8%	6,2%	88,2%	11,2%	0,5%	100%
P-Wert	0,7387		0.402			

Tabelle 19: SNP rs4986790: Prozentuale Verteilung der Genotypen (2x4Felder Chi-Quadrat-Test) und der Allele A und G in der Studienpopulation in Abhängigkeit vom Geschlecht (Frauen) sowie die zugehörigen p-Werte. MA: Minorallel

#### 5.4.1.2 Polymorphismus rs4263839

Auch für den Polymorphismus rs4263839 lässt sich kein signifikanter Unterschied bei den Frauen und bei den Männern hinsichtlich der Allel- und Genotypenfrequenz feststellen.

Das Wildtypallel G ist in beiden Gruppen vorherrschend. In der Patientengruppe kommt der Genotyp AG sowohl bei den Männern als auch bei den Frauen am häufigsten vor. In der Kontrollgruppe ist Genotyp GG sowohl bei den Männern als auch bei den Frauen am häufigsten. Die Unterschiede erreichen das Signifikanzniveau nicht.

<b>Männer</b>	Allelfrequenz		Genotypverteilung			Gesamt
	G	A(MA)	GG	AG	AA	
Patientengruppe	202 68,2%	94 31,8%	67 45,3%	68 45,9%	13 8,8%	148 100%
Kontrollgruppe	506 68,6%	232 31,4%	137 46,9%	160 43,4%	36 9,8%	369 100%
Gesamt	708 68,5%	326 31,5%	240 46,4%	228 44,1%	49 9,5%	517 100%
P-Wert	0,9202		0,850			

Tabelle 20: SNP rs4263839: Prozentuale Verteilung der Genotypen (2x4Felder Chi-Quadrat-Test) und der Allele G und A in der Studienpopulation in Abhängigkeit vom Geschlecht (Männer) sowie die zugehörigen p-Werte MA: Minorallel

<b>Frauen</b>	Allelfrequenz		Genotypverteilung			Gesamt
	G	A(MA)	GG	AG	AA	
Patientengruppe	213 62%	131 38%	65 37,8%	83 48,3%	24 14,0%	172 100%
Kontrollgruppe	260 68,4%	120 31,6%	89 46,8%	82 43,2%	19 10,0%	190 100%
Gesamt	473 65,3%	251 34,7%	154 45,6%	165 44,5%	43 11,9%	362 100%
P-Wert	0,0667		0,179			

Tabelle 21: SNP rs4263839: Prozentuale Verteilung der Genotypen (2x4Felder Chi-Quadrat-Test) und der Allele G und A in der Studienpopulation in Abhängigkeit vom Geschlecht (Frauen) sowie die zugehörigen p-Werte. MA: Minorallel



#### 5.4.1.3 Polymorphismus rs10758669

Vergleicht man die Allel- und Genotypfrequenz für den Polymorphismus rs10758669, lässt sich kein signifikanter Unterschied zwischen Kontroll- und Patientengruppe und damit auch keine Assoziation zur Erkrankung der chronischen Parodontitis feststellen. Das Wildtypallel A kommt sowohl in der Patientengruppe als auch in der Kontrollgruppe bei Männern wie bei Frauen am häufigsten vor. Bei den männlichen Patienten kommt der Genotyp AC mit einer Frequenz von 46,6% vor, bei den männlichen Kontrollen ist der Genotyp AA mit 45,7% am häufigsten. Bei den weiblichen Studienteilnehmern ist sowohl in der Patienten- als auch in der Kontrollgruppe der Genotyp AC am häufigsten vertreten.

<b>Männer</b>	Allelfrequenz		Genotypverteilung			Gesamt
	A	C(MA)	AA	AC	CC	
Patientengruppe	180 61,6%	112 38,4%	56 38,4%	68 46,6%	22 15,1%	146 100%
Kontrollgruppe	488 67,2%	238 32,8%	166 45,7%	156 43,0%	41 11,3%	363 100%
Gesamt	668 65,6%	350 34,4%	222 43,6%	224 44,0%	63 12,4%	509 100%
P-Wert	0,0907		0,246			

Tabelle 22: SNP rs10758669: Prozentuale Verteilung der Genotypen (2x4Felder Chi-Quadrat-Test) und der Allele A und C in der Studienpopulation in Abhängigkeit vom Geschlecht (Männer) sowie die zugehörigen p-Werte. MA: Minorallel

<b>Frauen</b>	Allelfrequenz		Genotypverteilung			Gesamt
	A	C(MA)	AA	AC	CC	
Patientengruppe	208 61,9%	128 38,1%	66 39,3%	76 45,2%	26 15,5%	168 100%
Kontrollgruppe	251 65,4%	133 34,6%	83 43,2%	85 44,3%	24 12,5%	192 100%
Gesamt	495 63,8%	261 36,2%	149 41,4%	161 44,7%	50 13,9%	360 100%
P-wert	0,3355		0,629			

Tabelle 23: SNP rs10758669: Prozentuale Verteilung der Genotypen (2x4Felder Chi-Quadrat-Test) und der Allele A und C in der Studienpopulation in Abhängigkeit vom Geschlecht (Frauen) sowie die zugehörigen p-Werte. MA: Minorallel

#### 5.4.2 Vergleich mit den untersuchten Polymorphismen auf Chromosom 16

##### 5.4.2.1 Polymorphismus rs2066845

Für den Polymorphismus rs2066845 auf Chromosom 16 lässt sich kein signifikanter Unterschied bei den Männern feststellen. Weder die Allelverteilung ( $p=0,5740$ ) noch die Genotypenfrequenz ( $p=0,508$ ) ist signifikant unterschiedlich. Das Wildtypallel G und der Genotyp GG kommen sowohl in der Patienten- als auch in der Kontrollgruppe bei den Männern am häufigsten vor.

<b>Männer</b>	Allelfrequenz		Genotypverteilung			Gesamt
	G	C(MA)	GG	GC	CC	
Patientengruppe	212 98,1%	4 1,9%	104 96,3%	4 3,7%	0 0%	108 100%
Kontrollgruppe	600 98,7%	8 1,3%	297 97,7%	6 2,0%	1 0,3%	304 100%
Gesamt	812 98,5%	12 1,5%	401 97,3%	10 2,4%	1 0,2%	412 100%
P-Wert	0,5740		0,508			

Tabelle 24: SNP rs2066845: Prozentuale Verteilung der Genotypen (2x4Felder Chi-Quadrat-Test) und Allele C und G in der Studienpopulation in Abhängigkeit vom Geschlecht (Männer)  
MA: Minorallel

Frauen	Allelfrequenz		Genotypverteilung			Gesamt
	G	C(MA)	GG	GC	CC	
Patientengruppe	255	5	125	5	0	130
	98%	2%	96,2%	3,8%	0%	100%
Kontrollgruppe	317	11	153	11	0	164
	96,6%	3,4%	93,3%	6,7%	0%	100%
Gesamt	572	16	278	16	0	294
	97,3%	2,7%	94,6%	5,4%	0%	100%
P-Wert	0,5651		0,283			

Tabelle 25: SNP rs2066845: Prozentuale Verteilung der Genotypen (2x4Felder Chi-Quadrat-Test) und Allele C und G in der Studienpopulation in Abhängigkeit vom Geschlecht (Frauen) MA: Minorallel

Bei den Frauen weist weder die Genotypverteilung noch die Allelverteilung einen signifikanten Unterschied zwischen den Studiengruppen auf ( $p=0,283$ ,  $p=0,561$ ). Bei den weiblichen Patienten kommt der Genotyp GG (96,2%) am häufigsten vor, ebenso bei den weiblichen Kontrollen (93,3%). Der Genotyp GC kommt bei den weiblichen Kontrollen mit 6,7% häufiger vor als bei den weiblichen Patienten mit 3,8%. Der Genotyp CC kommt in beiden Gruppen nicht vor.

#### 5.4.2.2 Polymorphismus rs2066844

Bei diesem Polymorphismus auf Chromosom 16 lassen sich keine signifikanten Unterschiede oder eine Assoziation zur Erkrankung der chronischen Parodontitis feststellen, wie der Vergleich der Häufigkeit der Allele und die Verteilung der Genotypenfrequenz zeigt. Der Genotyp CC und das Wildtypallel C kommen in beiden Gruppen und bei beiden Geschlechtern am häufigsten vor.

<b>Männer</b>	Allelfrequenz		Genotypverteilung			Gesamt
	C	T(MA)	CC	CT	TT	
Patientengruppe	283	15	136	11	2	149
	95%	5%	91,3%	7,4%	1,3%	100%
Kontrollgruppe	711	35	340	31	2	373
	95,3%	4,7%	91,2%	8,3%	0,5%	100%
Gesamt	994	50	476	42	4	522
	95,2%	4,8%	91,2%	8,0%	0,8%	100%
P-Wert	0,8153		0,601			

Tabelle 26: SNP rs2066844: Prozentuale Verteilung der Genotypen (2x4Felder Chi-Quadrat-Test) und der Allele C und T in der Studienpopulation in Abhängigkeit vom Geschlecht (Männer). Sowie die zugehörigen p-Werte. MA: Minorallel

Frauen	Allelfrequenz		Genotypverteilung			Gesamt
	C	T(MA)	CC	CT	TT	
Patientengruppe	333	11	162	9	1	172
	96,8%	3,2%	94,2%	5,2%	0,6%	100%
Kontrollgruppe	368	16	176	16	0	192
	95,8%	4,2%	91,7%	8,3%	0%	100%
Gesamt	701	27	338	25	1	364
	96,3%	3,7%	92,9%	6,9%	0,3%	100%
P-wert	0,4910		0,475			

Tabelle 27: SNP rs2066844: Prozentuale Verteilung der Genotypen (2x4Felder Chi-Quadrat-Test) und der Allele C und T in der Studienpopulation in Abhängigkeit vom Geschlecht (Frauen) sowie die zugehörigen p-Werte. MA: Minorallel

## 5.5 Allel- und Genotypfrequenz in Abhängigkeit vom Nikotinabusus

Um Unterschiede in der Allel- und Genotypverteilung unter dem Einflussfaktor des Rauchens aufzuzeigen, wurden die Gruppen der Raucher und der Nichtraucher getrennt untersucht.

### 5.5.1 Vergleich mit den untersuchten Polymorphismen auf Chromosom 9

#### 5.5.1.1 Polymorphismus rs4986790

Die Verteilung der Allel- und Genotypfrequenz unter Beachtung des Rauchverhaltens lassen keinen signifikanten Unterschied zwischen Kontrollgruppe und Patientengruppe erkennen, was der p-Wert der Allelfrequenz bei den Nichtrauchern ( $p=0,4067$ ) und bei den Rauchern ( $p=0,1161$ ) und ebenso der Genotypfrequenz bei den Nichtrauchern ( $p=0,385$ ) und bei den Rauchern ( $p=0,097$ ) verdeutlicht.

<b>Nichtraucher</b>	Allelfrequenz		Genotypverteilung			Gesamt
	A	G(MA)	AA	AG	GG	
Patientengruppe	386 93,7%	26 6,3%	180 87,4%	26 12,6%	0 0%	206 100%
Kontrollgruppe	560 94,9%	30 5,1%	266 90,2%	28 9,5%	1 0,3%	295 100%
Gesamt	946 94,4%	56 5,6%	446 89%	54 10,8%	1 0,2%	501 100%
p-Wert	0,4067		0,385			

Tabelle 28: SNP rs4986790: Prozentuale Verteilung der Genotypen (2x4Felder Chi-Quadrat-Test) und der Allele A und G in der Studienpopulation in Abhängigkeit vom Nikotinabusus (Nichtraucher) sowie die zugehörigen p-Werte. MA: Minorallel

Raucher	Allelfrequenz		Genotypverteilung			Gesamt
	A	G(MA)	AA	AG	GG	
Patientengruppe	188 96,9%	6 3,1%	91 93,8%	6 6,2%	0 0%	97 100%
Kontrollgruppe	74 92,5%	6 7,5%	34 85%	6 15,0%	0 0%	40 100%
Gesamt	262 95,6%	12 4,4%	125 91,2%	12 8,8%	0 0%	137 100%
p-Wert	0,1161		0,097			

Tabelle 29: SNP rs4986790: Prozentuale Verteilung der Genotypen (2x4Felder Chi-Quadrat-Test) und der Allele A und G in der Studienpopulation in Abhängigkeit vom Nikotinabusus (Raucher) sowie die zugehörigen p-Werte. MA: Minorallel

#### 5.5.1.2 Polymorphismus rs4263839

Für den Polymorphismus rs4263839 ist sowohl bei den Nichtrauchern als auch bei den Rauchern das Wildtypallel G, sowohl in der Patienten- als auch in der Kontrollgruppe am häufigsten.

Bei den Nichtrauchern der Patientengruppe ist der Genotyp AG am häufigsten vertreten (48,1%), bei den Nichtrauchern der Kontrollgruppe ist der häufigste Genotyp GG (45,7%). Der Unterschied der Genotypenfrequenz ( $p=0,182$ ) und der Allelfrequenz ( $p=0,0732$ ) ist nicht signifikant.



<b>Nichtraucher</b>	Allelfrequenz		Genotypverteilung			Gesamt
	G	A(MA)	GG	AG	AA	
Patientengruppe	259 62,9%	153 37,1%	80 38,8%	99 48,1%	27 13,1%	206 100%
Kontrollgruppe	395 68,3%	183 31,7%	132 45,7%	131 45,3%	26 9,0%	289 100%
Gesamt	654 66,1%	336 33,9%	212 42,8%	230 46,5%	53 10,7%	495 100%
p-Wert	0,0732		0,182			

Tabelle 30: SNP rs4263839: Prozentuale Verteilung der Genotypen (2x4Felder Chi-Quadrat-Test) und der Allele G und A in der Studienpopulation in Abhängigkeit vom Nikotinabusus (Nichtraucher) sowie die zugehörigen p-Werte. MA: Minorallel

Bei den Rauchern lässt sich kein signifikanter Unterschied in Hinsicht auf die Allelfrequenz ( $p=0,4575$ ) und Genotypenverteilung ( $p=0,199$ ) feststellen.

<b>Raucher</b>	Allelfrequenz		Genotypverteilung			Gesamt
	G	A(MA)	GG	AG	AA	
Patientengruppe	130 67,7%	62 32,3%	43 44,8%	44 45,8%	9 9,4%	96 100%
Kontrollgruppe	55 72,4%	21 27,6%	22 57,9%	11 28,9%	5 13,2%	38 100%
Gesamt	185 69,0%	83 31%	65 48,5%	55 41,0%	14 10,0%	134 100%
p-Wert	0,4575		0,199			

Tabelle 31: SNP rs4263839: Prozentuale Verteilung der Genotypen (2x4Felder Chi-Quadrat-Test) und der Allele G und A in der Studienpopulation in Abhängigkeit vom Nikotinabusus (Raucher) sowie die zugehörigen p-Werte. MA: Minorallel

### 5.5.1.3. Polymorphismus rs10758669

Betrachtet man den Polymorphismus rs10758669 nach Stratifikation der Studienpopulation hinsichtlich des Rauchverhaltens lassen Genotypfrequenz ( $p=0,865$ ) und Allelfrequenz ( $p=0,6330$ ) der Nichtraucher keine Assoziation erkennen.

Nichtraucher	Allelfrequenz		Genotypverteilung			Gesamt
	A	C(MA)	AA	AC	CC	
Patientengruppe	266 65,8%	138 34,2%	88 43,6%	90 44,6%	24 11,9%	202 100%
Kontrollgruppe	389 67,3%	189 32,7%	133 46,0%	123 42,6%	33 11,4%	289 100%
Gesamt	655 66,7%	327 33,3%	221 45,0%	213 43,4%	57 11,6%	491 100%
p-Wert	0,6330		0,865			

Tabelle 32: SNP rs10758669: Prozentuale Verteilung der Genotypen (2x4Felder Chi-Quadrat-Test) und der Allele A und C in der Studienpopulation in Abhängigkeit vom Nikotinabusus (Nichtraucher) sowie die zugehörigen p-Werte. MA: Minorallel

In der Gruppe der Raucher kommt das Wildtypallel A sowohl in der Patienten- als auch in der Kontrollgruppe am häufigsten vor (54,8% bzw. 67,5%). Der Unterschied der Allelverteilung ( $p=0,0544$ ) zwischen den beiden Gruppen ist nicht signifikant. Der Genotyp AC kommt mit 45,7% in der Patientengruppe am häufigsten vor, der Genotyp AA ist mit 52,5% am häufigsten in der Kontrollgruppe vertreten. Die Genotypverteilung zwischen den beiden Gruppen ist nicht unterschiedlich ( $p=0,077$ ).

Raucher	Allelfrequenz		Genotypverteilung			Gesamt
	A	C(MA)	AA	AC	CC	
Patientengruppe	103	85	30	43	21	94
	54,8%	45,2%	31,9%	45,7%	22,3%	100%
Kontrollgruppe	54	26	21	12	7	40
	67,5%	32,5%	52,5%	30,0%	17,5%	100%
Gesamt	157	111	51	55	28	134
	58,6%	41,4%	38,1%	41,0%	20,9%	100%
p-Wert	0,0544		0,077			

Tabelle 33: SNP rs10758669: Prozentuale Verteilung der Genotypen(2x4Felder Chi-Quadrat-Test) und der Allele A und C in der Studienpopulation in Abhängigkeit vom Nikotinabusus (Raucher) sowie die zugehörigen p-Werte. MA: Minorallel

## 5.5.2 Vergleich mit den untersuchten Polymorphismen auf Chromosom 16

### 5.5.2.1 Polymorphismus rs2066845

In der Gruppe der Nichtraucher unter den Patienten kommt der Genotyp GG mit 96,7% am häufigsten vor, der Genotyp GC mit 3,3% und der Genotyp CC mit 0% vor. Auch in der Kontrollgruppe ist der Genotyp GG mit 96,6% am häufigsten vertreten. Das Wildtypallel G ist in beiden Gruppen vorherrschend. Für den Polymorphismus rs2066845 auf Chromosom 16 ist sowohl für die Genotypenfrequenz ( $p=0,937$ ) als auch für die Allelfrequenz ( $p=0,9376$ ) in der Gruppe der Nichtraucher kein signifikanter Unterschied feststellbar.

Nichtraucher	Allelfrequenz		Genotypverteilung			Gesamt
	G	C(MA)	GG	GC	CC	
Patientengruppe	299 98,4%	5 1,6%	147 96,7%	5 3,3%	0 0%	152 100%
Kontrollgruppe	515 98,3%	9 1,7%	253 96,6%	9 3,4%	0 0%	262 100%
Gesamt	814 98,3%	14 1,7%	400 96,6%	14 3,4%	0 0%	414 100%
p-Wert	0,9376		0,937			

Tabelle 34: SNP rs2066845: Prozentuale Verteilung der Genotypen (2x4Felder Chi-Quadrat-Test) und Allele C und G in der Studienpopulation in Abhängigkeit vom Nikotinabusus (Nichtraucher) MA: Minorallel

Die Allelfrequenz ( $p=0,5985$ ) und die Genotypverteilung ( $p=0,589$ ) der Gruppe der Raucher lässt keinen signifikanten Unterschied zwischen Kontroll- und Patientengruppe erkennen.

Raucher	Allelfrequenz		Genotypverteilung			Gesamt
	G	C(MA)	GG	GC	CC	
Patientengruppe	148 97,4%	4 2,6%	72 94,7%	4 5,3%	0 0%	76 100%
Kontrollgruppe	67 98,5%	1 1,5%	33 97,1%	1 2,9%	0 0%	34 100%
Gesamt	215 97,7%	5 2,3%	105 95,5%	5 4,5%	0 0%	110 100%
p-Wert	0,5985		0,589			

Tabelle 35: SNP rs2066845: Prozentuale Verteilung der Genotypen (2x4Felder Chi-Quadrat-Test) und Allele C und G in der Studienpopulation in Abhängigkeit vom Nikotinabusus (Raucher) MA: Minorallel

#### 5.5.2.2 Polymorphismus rs2066844

Bei den Nichtrauchern kommt sowohl in der Patientengruppe als auch in der Kontrollgruppe das Wildtypallel C mit 96,1% bzw mit 94,4% am häufigsten vor. Das mutierte Allel T kommt in der Gruppe der nicht rauchenden Patienten mit einer Häufigkeit von 3,9% vor, in der Gruppe der nicht rauchenden Kontrollen mit 5,6%. In beiden Gruppen ist der Genotyp CC am häufigsten vertreten. Die Allelverteilung ( $p=0,2151$ ) und die Genotypfrequenz ( $p=0,125$ ) sind nicht signifikant unterschiedlich.

Nichtraucher	Allelfrequenz		Genotypverteilung			Gesamt
	C	T(MA)	CC	CT	TT	
Patientengruppe	396 96,1%	16 3,9%	192 93,2%	12 5,8%	2 1,0%	206 100%
Kontrollgruppe	555 94,4%	33 5,6%	262 89,1%	31 10,5%	1 0,3%	294 100%
Gesamt	951 95,1%	49 4,9%	454 90,8%	43 8,6%	3 0,6%	500 100%
P-Wert	0,2151		0,125			

Tabelle 36: SNP rs2066844: Prozentuale Verteilung der Genotypen (2x4Felder Chi-Quadrat-Test) und der Allele C und T in der Studienpopulation in Abhängigkeit vom Nikotinabusus (Nichtraucher) sowie die zugehörigen p-Werte. MA: Minorallel

In der Gruppe der Raucher ist sowohl bei den Patienten als auch bei den Kontrollen das Wildtypallel C am häufigsten, ebenso der Genotyp CC. Es gibt keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Allelverteilung ( $p=0,5403$ ) und der Genotypverteilung ( $p=0,791$ ).

Raucher	Allelfrequenz		Genotypverteilung			Gesamt
	C	T(MA)	CC	CT	TT	
Patientengruppe	186	8	90	6	1	97
	95,5%	4,1%	92,8%	6,2%	1%	100%
Kontrollgruppe	76	2	37	2	0	39
	97,4%	2,6%	94,9%	5,1%	0%	100%
Gesamt	262	10	127	8	1	136
	96,3%	3,7%	93,4%	5,9%	0,7%	100%
P-Wert	0,5403		0,791			

Tabelle 37: SNP rs2066844: Prozentuale Verteilung der Genotypen (2x4Felder Chi-Quadrat-Test) und der Allele C und T in der Studienpopulation in Abhängigkeit vom Nikotinabusus (Raucher) sowie die zugehörigen p-Werte. MA: Minorallel

## 5.6 Multinominale logistische Regression

Mit Hilfe der multinominalen Regressionsanalyse wurde die Wirkung der Einflüsse Alter, Geschlecht und Rauchen auf die chronische Parodontitis untersucht. Das Alter, Geschlecht und Rauchen beeinflussen die Erkrankung der chronischen Parodontitis signifikant. Von den im Modell berücksichtigten Genpolymorphismen korreliert nach Bonferroni-Korrektur keiner positiv mit der chronischen Parodontitis.

Parameter	-2Log-Likelihood für reduziertes Modell	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Signifikanz (p-Wert)
Konstanter Term	622,533	112,593	1	0,000
Geschlecht	541,872	31,932	1	0,000
Raucher	553,112	43,173	1	0,000
Alter	576,274	66,334	1	0,000
rs4986790	510,146	0,207	1	0,649
rs4263839	513,944	4,005	1	0,045
rs10758669	510,416	0,476	1	0,490
rs2066845	510,275	0,336	1	0,562
rs2066844	510,768	0,829	1	0,363

Tabelle 38: Likelihood-Quotienten-Tests



## 5.7 Kopplungsanalyse in der Studienpopulation

Wie Tabelle 39 und 40 zu entnehmen ist, sind alle Werte der D' Statistik und der R Statistik unter 0,9 bzw. 0,8, es besteht somit keine Kopplung.

D' Statistik	rs4986790	rs4263839	rs10758669
rs4986790	*	0,1596	0,0114
rs4263839	*	*	0,1135
rs10758669	*	*	*
R Statistik			
rs4986790	*	0,0583	0,0114
rs 4263839	*	*	0,1135
rs10758669	*	*	*

Tabelle 39: D' Statistik und R Statistik für die Kopplungsungleichgewichtsanalyse der SNP auf Chromosom 9

D' Statistik	rs2066845	rs2066844
rs2066845	*	0,0078
rs2066844	*	*
R Statistik		
rs2066845	*	0,0053
rs3066844	*	*

Tabelle 40: D' Statistik und R Statistik für die Kopplungsungleichgewichtsanalyse der SNP auf Chromosom 16

## 5.8 Haplotypenanalyse

In dieser Studie wurde eine Schätzung der Haplotypfrequenzen, eine Assoziation der festgelegten Haplotypen mit der chronischen Parodontitis für die gesamte Studienpopulation und eine Assoziation nach Korrektur hinsichtlich Alter, Geschlecht und Rauchen durchgeführt.

### 5.8.1 Schätzung der Haploypen auf Chromosom 9 und Chromosom 16

Die Anzahl der Haplotypen wird bei biallelischen Polymorphismen durch die theoretisch möglichen Allelkombinationen an den benachbarten Genorten bestimmt. Rechnerisch kann durch die Analyse der tatsächlichen Allelfrequenzen an den Genorten die vermutliche Häufigkeit der Haplotypen ermittelt werden. In die Assoziationsanalyse werden in der Regel nur Haplotypen einbezogen, die eine rechnerische Häufigkeit von mindestens 1% zeigen. Tabellen 43 und 44 zeigen die geschätzten Haplotypfrequenzen für die SNPs auf Chromosom 9 und 16.

	rs498 6790	rs426 3839	rs107 58669	Total	Pa	Ko	Ku Fr
1	A	G	A	0,4049	0,3525	0,4359	0,4049
2	A	G	C	0,2349	0,2634	0,2155	0,6398
3	A	A	A	0,2056	0,2345	0,1882	0,8454
4	A	A	C	0,0939	0,0932	0,0972	0,9393
5	G	G	A	0,0199	0,0231	0,0203	0,9592
6	G	A	A	0,0191	0,0112	0,0211	0,9783
7	G	C	C	0,0145	0,013	0,0158	0,9928
8	G	C	C	0,0072	0,0085	0,005	1

Tabelle 41: Haplotyp-Frequenz-Schätzung Chromosom 9(n=922) Pa: Parodontitisgruppe, Ko: Kontrollgruppe, Ku.Fr: kumulative Frequenz

	rs2066845	rs2066844	Total	Pa	Ko	Ku Fr
1	G	C	0,9361	0,9369	0,9352	0,9361
2	G	T	0,0433	0,0416	0,0446	0,9793
3	C	C	0,0196	0,0196	0,0201	0,9989
4	C	T	0,0011	0,0019	1e-04	1

Tabelle 42: Haplotyp-Frequenz-Schätzung Chromosom 16 (n=917) Pa: Parodontitisgruppe, Ko: Kontrollgruppe, Ku Fr: kumulative Frequenz

### 5.8.2 Assoziation der Haplotypen auf Chromosom 9 mit der chronischen Parodontitis

Betrachtet man die Haplotypenanalyse für die Polymorphismen auf Chromosom 9 (rs4986790, rs4263839, rs20758669), zeigt sich nach der Bonferroni-Korrektur für multiples Testen eine Signifikanz für den Haplotyp AGC ( $p=0,0042$ ) und für den Haplotyp AAA ( $p=0,0056$ ).

	rs4986790	rs4263839	rs10758669	Freq	OR (95%CI)	P-Wert
1	A	G	A	0,4051	1,00	----
2	A	G	C	0,233	0,64	<b>0,0042</b>
3	A	A	A	0,2045	0,64	<b>0,0056</b>
4	A	A	C	0,0967	0,88	0,54
5	G	G	A	0,0213	0,71	0,52
6	G	A	A	0,0188	1,39	0,64
7	G	G	C	0,015	1,12	0,87
8 selten	*	*	*	0,0056	0,3	0,55
Globale Haplotyp Assoziation p-Wert 0,092						

Tabelle 43: Haplotypassoziation mit Antwort (n=922, unbearbeitete Analyse) Freq: Frequenz, OR: Odds ratio, CI: Koinfidenzintervall

Nach Adjustierung der Kovariablen Alter, Geschlecht und Rauchen lässt sich nach der Bonferroni-Korrektur keine signifikante Assoziation nachweisen (Tabelle 44).

	rs4986790	rs4263839	rs10758669	Freq	OR (95% CI)	P-Wert
1	A	G	A	0,3957	1	-----
2	A	G	C	0,2403	0,72	0,092
3	A	A	A	0,2183	0,6	0,012
4	A	A	C	0,0929	0,81	0,41
5	G	G	A	0,0186	0,9	0,88
6	G	A	A	0,0161	1,02	0,97
7	G	G	C	0,0115	1,02	0,99
8 selten	*	*	*	0,0064	0,19	0,23
Globale Haplotyp Assoziation p-Wert 0,25						

Tabelle 44: Haplotypassoziation mit Antwort (n=639, angepasst an Alter, Geschlecht, Rauchen)  
Freq: Frequenz, OR: Odds ratio, CI: Koinfidenzintervall

### 5.8.3 Assoziation der Haplotypen auf Chromosom 16 mit der chronischen Parodontitis

Die Haplotypanalyse für die Polymorphismen auf Chromosom 16 ergibt keine signifikante Assoziation (Tabelle 47).

	rs2066845	rs2066844	Freq	OR (95% CI)	P-Wert
1	G	C	0,9357	1.00	-----
2	G	T	0,0435	1.11	0,65
3	C	C	0,02	1.03	0,94
4 selten	*	*	7e-04	0.01	1
Globale Haplotyp Assoziation p-Wert 0,83					

Tabelle 45: Haplotypassoziation mit Antwort (n=917, unbearbeitete Analyse) Freq: Frequenz, OR: Odds Ratio, CI: Koinfidenzintervall

Auch nach Adjustierung bezüglich Alter, Geschlecht und Rauchen zeigt sich keine Signifikanz (Tabelle 48).

	rs2066845	rs2066844	Freq	OR (95% CI)	P-Wert
1	G	C	0,9378	1.00	-----
2	G	T	0,0442	1.39	0,29
3	C	C	0,0165	1.35	0,59
4 selten	*	*	0,0015	1.88	0,79
Globale Haplotyp Assoziation p-Wert 0,67					

Tabelle 46: Haplotypassoziation mit Antwort (n=635, angepasst an Alter, Geschlecht, Rauchen) Freq: Frequenz, OR: Odds Ratio, CI: Koinfidenzintervall

## 6 Diskussion

### 6.1 Bewertung von Assoziationsstudien als Methode zur Analyse der genetischen Komponente der chronischen Parodontitis

Genomweite Assoziationsstudien (GWAS) erlauben es, den genetischen Hintergrund von Erkrankungen mit komplexem Erbgang zu detektieren (Ohashi et al. 2011). Ein Vorteil der GWAS besteht darin, dass mehrere tausend SNPs in vielen Proben in einem Experiment untersucht werden können (Detera-Wadleigh et al. 2004). So können theoretisch die krankheitsassoziierten SNPs, welche mindestens 1% zur Varianz der Erkrankung beitragen, mit einer Sicherheit von ca. 90% aufgefunden werden (Elston et al. 2007).

Nachteile und Einschränkungen von GWAS sind jedoch, dass seltene Varianten unentdeckt bleiben. Nur Varianten mit einer Minor-Allel-Frequenz größer als 5% werden durch solche Studien erkannt. Meist führt jedoch eine Kombination von häufigen und seltenen Varianten zum erhöhten Erkrankungsrisiko (Asimit et al. 2010). Weiterhin werden durch GWAS nur korrelative Resultate geliefert. Es wird nach Loci gesucht, die mit dem Phänotyp zusammen auftreten. Der genaue kausale Zusammenhang bleibt ungeklärt (Begum et al. 2012). Des Weiteren werden in GWAS die Interaktion zwischen unterschiedlichen genetischen Loci (Epistase) und das Zusammenspiel zwischen diesen Genorten und Umweltfaktoren (epigenetische Effekte) nicht berücksichtigt (Korte et al. 2013). Genomweite Assoziationsstudien identifizieren demnach Loci und nicht Gene per se, was die Identifikation von pathogenetischen Veränderungen auf einem assoziierten Haplotypen verkomplizieren kann (Hardy et al. 2009). Ferner muss noch viel mehr darüber in Erfahrung gebracht werden, wie intronische und intergenetische Regionen die Expression von Genen, die Kodierung von Proteinen und den Phänotyp von Erkrankungen beeinflussen, um die funktionelle Basis der beobachteten Assoziationen zu bestimmen (Hardy et al. 2009).

Nachteilig bei GWAS ist zusätzlich die große Anzahl an benötigten Studienteilnehmern, was eine organisatorische Herausforderung darstellt (Hirschhorn et al. 2005). Um eine ausreichende statistische Aussagekraft von genomweiten Assoziationsstudien zu erreichen, sollten Kontroll- und Patientengruppe auf 6000 oder mehr Teilnehmer erweitert werden (Wang et al. 2005). Eine derart große Studienpopulation an einem Standort zu rekrutieren erweist sich als schwierig. Somit müssten mehrere Forschungsgruppen zusammenarbeiten um valide Studienergebnisse zu erhalten

(McGovern et al. 2010). Außerdem erfordert die enorme Datenmenge auch einen erheblichen biometrisch-statistischen Aufwand (Murken et al. 2011).

Um GWAS bezüglich der chronischen Parodontitis durchführen zu können, müsste ein Konsortium gegründet werden, um zehntausende Proben zu vereinen und dadurch die genetischen Risikofaktoren aufdecken zu können (Vaithilingam et al. 2014).

Bisher hatten genomweite Assoziationsstudien hinsichtlich der chronischen Parodontitis nur moderaten Erfolg. Deswegen besteht die Notwendigkeit, die genetische Komponente der chronischen Parodontitis weiter zu untersuchen, indem größere Probenzahlen und Phenotypen hoher Qualität hinzugezogen werden (Offenbacher et al. 2016). Bezogen auf die aggressive Parodontitis konnten einige genomweite Assoziationsstudien zur Aufklärung des genetischen Hintergrunds dieser Erkrankung beitragen. Es konnte beispielsweise ein SNP im Glucosyltransferase-Gen GLT6D1 (rs1537415) signifikant mit aggressiver Parodontitis assoziiert werden (Schaefer et al. 2010). Zwei weitere GWAS zur chronischen Parodontitis konnten jedoch keine signifikanten Assoziationen mit diesem Gen finden (Vaithilingam et al. 2014). In Hinblick auf die chronische Parodontitis konnten Offenbacher et al. das BEGAIN-Gen (*Brain-enriched guanylate kinase-associated*) mit schwerer chronischer Parodontitis und das UBE3D-Gen (*Ubiquitin Proteinligase E3D*) mit der moderaten chronischen Parodontitis in Zusammenhang bringen. Zwei weitere GWAS zur chronischen Parodontitis konnten jedoch keine signifikanten Assoziationen mit bestimmten Genen oder Loci finden (Vaithilingam et al. 2014). Eine Herausforderung, die Vergleichbarkeit der Studienergebnisse betreffend, stellt außerdem der sehr unterschiedlich definierte Phänotyp der bisher publizierten GWAS zu dieser Erkrankung dar. Dies ist eine Ursache, welche GWAS zur chronischen Parodontitis, neben der zu geringen Probenanzahl, bisher limitiert (Vaithilingam et al. 2014).

In direkten Assoziationsstudien (Kandidatengestudien) wird dagegen nur eine kleine Menge von Genen gezielt betrachtet (Bickeböller et al. 2007). Direkte Assoziationsstudien sind eine potentiell aussagekräftige Methode um Gene aufzuspüren, die eine Krankheit verursachen oder beeinflussen. Dabei ist Voraussetzung, dass die Pathophysiologie der Krankheit erforscht ist. Die Identität des betreffenden Gens wird basierend auf biologischen Hypothesen oder dem Ort des Kandidatengens innerhalb einer vorab bestimmten Kopplungsregion vorhergesagt. Selbst wenn diese Annahmen

breit gefächert waren, kann jedoch nur ein Bruchteil an genetischen Risikofaktoren erfasst werden (Hirschhorn et al. 2005).

Unter Beachtung epidemiologischer Prinzipien können direkte Assoziationsstudien zur Aufdeckung der genetischen Komponente komplexer Erkrankungen, wie der chronischen Parodontitis beitragen. Wird eine signifikante Assoziation entdeckt, kann diese möglicherweise unter exakt gleichen Studienbedingungen in unabhängigen Populationen repliziert und verifiziert werden. Die genetischen Assoziationen können hinsichtlich ähnlicher Krankheitsbilder mit eventuell vergleichbarer Pathogenese näher untersucht werden. Sie können Hinweise auf molekulare oder biochemische Mechanismen liefern und Einblicke in die Pathologie der Erkrankung geben (Tabor et al. 2002). Außerdem sind direkte Assoziationsstudien kostengünstiger und einfacher durchführbar als GWAS (Hirschhorn et al. 2005).

Zahlreiche Erkenntnisse zum genetischen Hintergrund der chronischen Parodontitis sind auf direkte Assoziationsstudien zurückzuführen, wobei meist nach einem Zusammenhang zwischen SNPs und der Erkrankung gesucht wurde. Da immunologische Prozesse im Zuge der Erkrankung der chronischen Parodontitis zur Zerstörung des parodontalen Gewebes beitragen, wurden vor allem Kandidaten-Gene, die für die Reaktion des Immunsystems von Bedeutung sind, näher betrachtet (Yoshie et al. 2007).

Bezugnehmend auf die Erkrankung der chronischen Parodontitis ergibt sich die Problematik, dass viele genetische Einflüsse nur einen sehr kleinen Effekt auf die Erkrankung haben (Cardon et al. 2001). Unerlässlich für eine direkte Assoziationsstudie hoher Qualität sind gut bestimmte Krankheitsbilder, eine ausreichend große Probenmenge, umsichtig ausgewählte genetische Marker sowie adäquate Standards bei der Genotypisierung, Analyse und Interpretation (Newton-Cheh et al. 2005). Kandidatengenstudien zu komplexen Erkrankungen hatten oft keine ausreichende statistische Power oder es wurden die falschen Kandidaten-Gene ausgewählt (Vaithilingam et al. 2014).



## 6.2 Studienpopulation

Die Studienpopulation vorliegender Studie umfasste ausschließlich Individuen mit kaukasischer Abstammung aus dem süddeutschen Raum. Darunter waren 352 Patienten die an chronischer Parodontitis erkrankt waren und 587 parodontal gesunde Personen. Die Studienteilnehmer waren nicht miteinander verwandt. Jede Probe wurde auf die Konzentration an enthaltener DNA überprüft und falls erforderlich verdünnt. Manche Proben konnten dennoch nicht typisiert werden. Mögliche Gründe hierfür sind Verunreinigung der Proben oder eine zu geringe Menge an enthaltener DNA. Diese Proben wurden in den Tabellen als fehlend bezeichnet.

In der Patientengruppe gab es mehr Raucher (100) als in der Kontrollgruppe (42). In beiden Gruppen waren mehr Nichtraucher vertreten (210 Nichtraucher in der Patientengruppe, 306 Nichtraucher in der Kontrollgruppe). Bei 11,32% der Patienten und bei 40,81% der Kontrollen fehlten die Angaben zum Rauchverhalten.

Nikotinabusus hat jedoch nachweislich Einfluss auf den Abbau des marginalen Knochens (Bahrami et al. 2016). Ein erkranktes Individuum könnte allerdings fälschlicherweise der gesunden Kontrollgruppe zugeordnet werden. Dies betrifft beispielsweise Patienten, die eine genetische Prädisposition zur chronischen Parodontitis aufweisen, welche jedoch erst in Kombination mit dem Risikofaktor Rauchen ausbrechen würde (Kinane et al. 2003). Weiterhin kann Rauchen die Bakterienzusammensetzung bei gesunden und bei kranken Individuen beeinflussen (Karasneh et al. 2017). In dieser Studie hatten 28% der Patienten ein höheres Risiko an einer chronischen Parodontitis zu erkranken, da sie rauchten. In der Kontrollgruppe gab es dagegen nur 7,2% Raucher. Zusätzlich zu berücksichtigen bleibt die große Anzahl an Teilnehmern, die keine Angaben zum Rauchverhalten machten.

Der Altersdurchschnitt der Parodontitisgruppe lag bei 52,4 Jahren, der der Kontrollgruppe bei 47,1 Jahren. Der Altersdurchschnitt der Kontrollgruppe war somit geringer als derjenige der Patientengruppe. Die Altersdifferenz von fünf Jahren war signifikant unterschiedlich und muss demnach bei der Bewertung der Ergebnisse berücksichtigt werden, da die chronische Parodontitis häufiger in fortgeschrittenem Alter auftritt (Kinane et al. 2003). Es könnte sein, dass Teilnehmer der Kontrollgruppe die genetische Prädisposition zur Entwicklung einer Parodontitis haben, die Erkrankung aber erst zu einem späteren Zeitpunkt ausbricht.

Bezogen auf das Geschlecht waren in der Parodontitisgruppe 46,6% männlich und 53,4% weibliche, in der Kontrollgruppe dagegen deutlich mehr männliche (66,4%) als weibliche (33,6%) Teilnehmer vertreten. Die Häufigkeit des Auftretens der chronischen Parodontitis hängt vor allem vom bakteriellen Befall und der Immun- und Entzündungsreaktion des Wirtes ab. Es existiert zudem ein geschlechtsabhängiger Unterschied (Borrell et al. 2005), wobei Männer tendenziell häufiger erkranken (Nunn et al. 2003). Dass in der Kontrollgruppe mehr Männer als Frauen vorhanden waren, wobei die Geschlechtsverteilung bei den Erkrankten fast ausgewogen war, sollte ebenfalls bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden.

Patienten mit schweren systemischen Grunderkrankungen wurden nicht in die Studienpopulation aufgenommen. Systemische Erkrankungen, die die Immunantwort beeinflussen oder Veränderungen im Gewebe zur Folge haben, sind häufig auch mit einem höheren Risiko an Parodontitis zu erkranken assoziiert (Meyle et al. 2001). Diabetes mellitus beispielsweise hat Einfluss auf das Auftreten einer Parodontitis, da dieser zu einer verstärkten Entzündungsreaktion und vermehrter Zerstörung des parodontalen Gewebes führt (Lalla et al. 2011).

Die chronische Parodontitis der Studienteilnehmer wurde mit Hilfe der Klassifikation der *American Association of Periodontology* und der EFP (European Federation of Periodontology) diagnostiziert (Armitage et al. 1999). Dennoch gestaltet sich manchmal die Unterscheidung zwischen der aggressiven und der chronischen Parodontitis als schwierig (Mombelli et al. 2002). Die aggressive Parodontitis ist gekennzeichnet durch schnelles Voranschreiten der Erkrankung, welche bereits in jungen Jahren unter Abwesenheit systemischer Erkrankungen beginnt. Es kann jedoch die Form der generalisierten aggressiven Parodontitis auch bei Personen über 30 und auch an mehr Zähnen als den ersten Molaren und Inzisiven auftreten, was eine Unterscheidung zur chronischen Parodontitis erschwert (Albandar et al. 2014).

Die Studienteilnehmer sollten möglichst die gleiche ethnische Herkunft haben, da zwischen den einzelnen Ethnien oft erhebliche genetische Unterschiede bestehen können auch bezogen auf die chronische Parodontitis (Loos et al. 2005, Hirschhorn et al. 2002, Weatherspoon et al. 2016). Um genetische Homogenität zu gewährleisten und das Risiko der Stratifikation zu minimieren, stammen die Teilnehmer dieser Studie deshalb alle aus dem süddeutschen Raum. Dies wurde durch anamnestische Befragung

bezüglich der Herkunft von Eltern und Großeltern der Studienteilnehmer festgestellt. Allein durch Befragung korrekte Aussagen über die genetische Abstammung eines Individuums zu erhalten, ist jedoch oft unzuverlässig. Populationsstratifikation tritt häufig bei Fall-Kontrollstudien auf, wenn Kontrollen und Patienten einen unterschiedlichen genetischen Hintergrund haben (Cardon et al. 2003). Es kann durch versteckte Populationsstratifikation zu positiven Assoziationen kommen, ohne dass ein tatsächlicher biologischer Zusammenhang zwischen dem untersuchten Marker und der Krankheit vorhanden ist, wenn die untersuchte Population aus zwei Subpopulationen besteht, in denen unterschiedliche Krankheitshäufigkeit und verschiedene Allelhäufigkeiten vorliegen. Um festzustellen ob Subpopulationen vorhanden sind, kann das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht herangezogen werden (Bickeböller et al. 2007). Um in dieser Studie sowohl systematische Fehler (Stratifikation) als auch Typisierungsfehler auszuschließen, sollte die Genotypverteilung der Kontrollgruppe dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht entsprechen. Alle fünf Polymorphismen befanden sich im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

Um auch schwache Assoziationen aufzuzeigen, sollte die Studienpopulation möglichst groß gewählt werden (Colhoun et al. 2003). Oft ist die Auswirkung der untersuchten Genvariante so gering, dass sie in kleinen Studiengruppen schwer auffindbar ist (Hirschhorn et al. 2005). Die Anzahl der Studienteilnehmer von 939 in dieser Studie ist nicht zu klein, um eine ausreichende statistische Power zu liefern. Replikationsstudien mit größeren Fallzahlen wären wünschenswert, wobei es sich schwierig gestaltet mehrere tausend Studienteilnehmer an einem Standort zu generieren und sowohl kosten- als auch zeiteffizient zu arbeiten (Hickey et al. 2018, McGovern et al. 2010). Die Kontrollgruppe dieser Studie war mit 587 Teilnehmern deutlich größer als die Patientengruppe mit 352 Teilnehmern, womit die Vorgabe, dass das Kontrollkollektiv eineinhalb bis zweimal so groß sein sollte, wie die Patientengruppe erfüllt wurde (Colhoun et al. 2003).

## 6.3 Studiendesign und Methodik

### 6.3.1 Auswahl der Kandidatengene

2017 berichteten Papageorgiou et al. von einem signifikanten Zusammenhang zwischen der chronischen Parodontitis und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (*Morbus Crohn* und *Colitis ulcerosa*), wobei neun Querschnittsstudien und insgesamt 1297 Patienten einbezogen wurden. Auch Brito et al. konnten 2008 feststellen, dass Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eine höhere Prävalenz hatten, an chronischer Parodontitis zu erkranken. Die Schlüsselmediatoren der Immunreaktion beider Erkrankungen, wie Zytokine und Matrixmetalloproteinasen, sind gleich (Kinane et al. 2007). Aufgrund der teilweisen Überschneidung in der Pathogenese von *Morbus Crohn* und chronischer Parodontitis wurden in dieser Studie Kandidatengene des *Morbus Crohn* auch auf einen Zusammenhang mit der chronischen Parodontitis getestet. Es wurden fünf Einzelnukleotidpolymorphismen als genetische Marker gewählt.

Die untersuchten Polymorphismen auf Chromosom 9 (rs4986790, rs4263839, rs10758669) und Chromosom 16 (rs2066845, rs2066844) konnten alle in Zusammenhang mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen gebracht werden (McGovern et al. 2010, Waterman et al. 2011, Wagner et al. 2013).

### 6.3.2 Validität der Genotypisierung via Maldi-TOF

Als Genotypisierungsmethode wurde die Maldi-TOF-Methode gewählt. Bei Untersuchungen von Blutproben hinsichtlich der Bakterienkontamination konnten Angeletti et al. 2015 feststellen, dass diese Methode eine hohe Rate an Identifikation unterschiedlicher Bakterienspezies gegenüber herkömmlichen Methoden, wie der DNA-Sequenzierung oder der PCR (Polymerasekettenreaktion) aufweist.

Maldi-TOF MS ist außerdem eine Technik mit großem Potential für valide Genotypisierung hoher Fallzahlen. Im Gegensatz zu anderen Methoden, wie z. B. der Polymerasekettenreaktion (PCR) oder der DNA-Sequenzierung, misst Maldi-TOF direkt das molekulare Gewicht der Oligonukleotide (Edwards et al. 2005). Die Methode ist geeignet für eine Hochdurchsatzgenotypisierung mit der Möglichkeit der exakten Quantifizierung von polymorphen DNA-Markern (Gut et al. 2004). Zur Qualitätssicherung der DNA Proben erfolgt eine Überprüfung mittels Polymerasekettenreaktion (PCR), wobei 10% der PCR-Produkte wiederum auf

Agarosegelen überprüft werden. Es werden je 2% Positiv-und Negativkontrollen in den DNA Proben eingebaut. Circa 10% der DNA Proben werden auf Fehler untersucht und doppelt genotypisiert (Illig et al. 2004). Derartige Kontrollen erlauben die Annahme, dass die Ergebnisse von hoher Qualität sind. Bei der MALDI-TOF Technik handelt es sich um ein sehr exaktes Verfahren, bei dem mit einer Genauigkeit von 0,1% - 0,01% auch sehr kleine DNA Abschnitte mit einer Größe von 3-30 Basen typisiert werden können (Schaeffeler et al. 2008, Illig et al. 2004). Alternativ hätte eine andere Methode, wie beispielsweise eine Polymerasekettenreaktion mit fluoreszenzmarkierten Sonden in Kombination mit einer Schmelzkurvenanalyse, durchgeführt werden können, was ebenfalls eine valide Möglichkeit darstellt, einzelne SNPs zu analysieren (Lachnik et al. 2002). Diese Technik ist jedoch sowohl zeitintensiver als auch teurer (Cherkaoui et al. 2010) und weist gegenüber Maldi-TOF Methode keine Vorteile hinsichtlich der Zuverlässigkeit und Genauigkeit auf (Griffin et al. 2000, Bray et al. 2001, Werner et al. 2002, Li et al. 2006)

#### **6.4 Vergleich der Frequenzen der Kontrollgruppe mit Kohorten der Literatur**

In Populationen mit nicht-kaukasischem genetischen Hintergrund können für die verschiedenen hier getesteten Gene teilweise abweichende Allel- und Genotypfrequenzen ermittelt werden. Im Allgemeinen wird angenommen, dass sich Populationen, die einen ähnlichen ethnischen Hintergrund aufweisen, in den Allelfrequenzen gleichen (Bickeböller et al. 2007). Der Vergleich zwischen der Kontrollgruppe bezogen auf die Genotypfrequenz wurde vorgenommen mit der CEU-Population, 90 Personen aus Utah mit nord- und westeuropäischen Wurzeln, die im Rahmen des HapMap-Projekts untersucht wurde (Daten für die Allelfrequenz und die Genotypfrequenz: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/tools/1000genomes/>). Außerdem wurde die Kontrollgruppe von Barret et al. (4829 Personen mit europäischen Vorfahren), welche die Allelfrequenzen beschreibt und die Kontrollgruppe von Franke et al. (15056 Personen mit europäischen Vorfahren), welche die Minor-Allel-Frequenz beschreibt, herangezogen (Barret et al. 2008, Franke et al. 2010). Bei der Studienpopulation von Waterman et al. handelt es sich um 2374 (1057 Kontrollen mit vornehmlich kaukasischer Abstammung) Studienteilnehmer aus Kanada, wobei die Minor-Allelfrequenz angegeben wurde (Waterman et al. 2011). Browning et al. untersuchte Studienteilnehmer kaukasischer Abstammung aus Neuseeland (416 Kontrollen). Die Genotypen und die Minor-Allel-Frequenz wurden angegeben (Browning et al. 2007). Bei Analyse dieser Daten (Tabelle 47 und 48) erkennt man, dass die Werte der verschiedenen Gruppen größtenteils übereinstimmen, sowohl hinsichtlich der Allel- als auch der Genotypfrequenzen. Dies lässt auf eine fehlerfreie Genotypisierung sowie auf eine gleichmäßige Zusammenstellung der Studienpopulation schließen.

SNP	Allel	Eigene Kontrollgruppe	CEU- Population	Franke et al.	Waterman et al.	Barrett et al.	Browning et al.
rs4986790	A	0,937	0,9596	-	-	-	0,947
	MA:G	0,063	0,0404	-	-	-	0,053
rs4263839	G	0,687	0,6111	-	0,6984	0,677	-
	MA:A	0,313	0,3889	-	0,3016	0,323	-
rs10758669	A	0,666	0,6414	0,651	-	0,625	-
	MA:C	0,334	0,3586	0,349	-	0,348	-
rs2066845	G	0,979	0,9798	-	0,9828	-	-
	MA:C	0,021	0,0202	-	0,0172	-	-
rs2066844	C	0,955	0,9293	-	0,9533	-	-
	MA:T	0,045	0,0707	-	0,0467	-	-

Tabelle 47: Vergleich der Allelfrequenzen der eigenen Kontrollgruppe mit der CEU-Population, der Franke et al., Waterman et al., Barrett et al., Browning et al. Kohorte. MA: Minorallel

Die Minorallelfrequenz des rs4986790 ist etwas größer als die der CEU-Population, jedoch ähnlich der Kohorte von Browning et al.. Die Allelfrequenzen sind vergleichbar. Für rs4263839 sind sowohl die Allelfrequenzen (Eigene Kontrollgruppe: 0,687, Barrett et al. Kohorte: 0,677) als auch die Minorallelfrequenzen ähnlich.

Auch für rs10758669 stimmen sowohl die Allelfrequenzen als auch die Minorallelfrequenzen mehrheitlich überein.

Für rs2066845 sind die Werte vergleichbar, sowohl für die Allelfrequenz (Eigene Kontrollgruppe: 0,979, CEU-Population: 0,9798) als auch für die Minorallelfrequenz (Eigene Kontrollgruppe: 0,021, CEU-Population: 0,0202.)

Die Allelfrequenz des rs2066844 stimmt mit den Allelfrequenzen der Kontrollpopulationen weitgehend überein (Eigene Kontrollgruppe: 0,955, Waterman et al. Kohorte: 0,9533). Die Minorallelfrequenz des rs2066844 ist etwas kleiner als die der CEU-Population, jedoch vergleichbar mit der der Waterman et al. Kohorte (0,0467).

Hieraus lässt sich erkennen, dass sowohl die Allelfrequenzen als auch die Minorallelfrequenzen der eigenen Kontrollgruppe in der gleichen Größenordnung der jeweiligen Vergleichskohorten liegen. Die Genotypisierung dieser Studie war somit wahrscheinlich erfolgreich.

SNP	Genotyp	Eigene Kontrollgruppe	CEU-Population
rs4986790	AA	0,877	0,9108
	AG	0,119	0,0594
	GG	0,035	0,0099
rs4263839	GG	0,472	0,3639
	GA	0,43	0,4653
	AA	0,098	0,1485
rs10758669	AA	0,45	0,396
	AC	0,431	0,4653
	CC	0,118	0,1188
rs2066845	GG	0,962	0,9405
	GC	0,036	0,0396
	CC	0,002	0,0
rs2066844	CC	0,914	0,8415
	CT	0,083	0,1386
	TT	0,004	0,0

Tabelle 48: Genotyp-Frequenzvergleich zwischen eigener Kontrollgruppe und der CEU Population

Auch die Genotypfrequenzen der eigenen Kontrollgruppe sind denen der CEU-Population ähnlich. Demnach können die Genotypisierung und die Auswahl der Probanden in dieser Studie geeignet sein, um die Fragestellung der Studie verlässlich zu klären.



## 6.5 Interpretation der Ergebnisse bezüglich möglicher Auswirkungen auf die chronische Parodontitis

### 6.5.1 Funktionelle Wirkung des Polymorphismus rs4986790 (Chromosom 9)

Für den Polymorphismus rs4986790 wies diese Studie keine Unterschiede hinsichtlich der Genotypfrequenz oder der Allelverteilung zwischen der Patienten- und der Kontrollgruppe auf. Das zugehörige Gen ist *TLR4* (Toll-like-Rezeptor 4). *TLR4* ist sowohl auf der Plasmamembran als auch im Endosom lokalisiert. TLR Signalwege werden initiiert durch Liganden induzierte Dimerisation des Rezeptors. *TLR4* wandert von der Plasmamembran ins Endosom um das Signal von MYD88 (*myeloid differentiation primary-response Protein 88*) auf TRIF (*TIR (Toll-Interleukin 1-Rezeptor) domain-containing adapter protein inducing interferon beta*) zu verändern. NF-kappa B und Interferon regulierende Faktoren (IRFs) werden aktiviert. *TLR4* erkennt beispielsweise LPS von *Aggregatibakter actinomycetemcomitans* im Zuge der Erkrankung der Parodontitis. Diese Interaktion führt über MYD88-abhängige und MYD88-unabhängige Signalwege zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass der Signalweg über MYD88 den Angelpunkt in *Aggregatibakter actinomycetemcomitans*-LPS-induzierter Osteoklastenformation und alveolarem Knochenabbau darstellt (Madeira et al. 2013). Da der Polymorphismus rs4986790 zu einer schwächeren Erkennung von LPS führt (Agnese et al. 2002), könnte er somit auch Auswirkungen auf die Erkrankung der chronischen Parodontitis nehmen, sollten sich die Ergebnisse des Mausmodells auf den Menschen übertragen lassen.

In Bezug auf Th17-Zellen beeinflusst *TLR4* sowohl die Immunantwort bei infektiösen als auch bei immunbedingten Erkrankungen (Happel et al. 2003, Abdollahi-Roodsaz et al. 2008). Th17-Zellen spielen eine Rolle bei der chronischen Parodontitis (Kramer et al. 2007).

Andere Studien haben bezüglich des SNPs rs4986790 einen Zusammenhang mit der chronischen Parodontitis feststellen können, auch wenn dies in der vorliegenden Studie nicht bestätigt werden konnte.

So konnten Gursoy et al. 2016 zeigen, dass Patienten mit dem SNP rs4986790 (Asp299Gly) und gleichzeitigem Vorkommen von *Porphyromonas gingivalis* in der Mundhöhle einen fortgeschrittenen Knochenabbau aufwiesen. Diese Daten können

genutzt werden, um Patienten mit dem *TLR4* Asp299Gly SNP, die positiv für *Porphyromonas gingivalis* getestet wurden, als anfällig zu charakterisieren und somit Risikogruppen für die Erkrankung der chronischen Parodontitis zu definieren (Gursoy et al. 2016).

Sellers et al. fand 2016 einen gegenteiligen Zusammenhang zwischen dem SNP rs4986790, parodontalem Knochenverlust und Parodontitis unter Einbeziehung des Auftretens von *Porphyromonas gingivalis*. Der *TLR4* Asp299Gly SNP interagiert signifikant mit *Porphyromonas gingivalis*, führte zu einem geringeren Risiko an Parodontitis zu erkranken und könnte protektiv gegen parodontalen Knochenabbau sein. Es war jedoch nur eine sehr geringe Anzahl an Teilnehmern (n=54) positiv für das *TLR4* Minor Allel und *Porphyromonas gingivalis*. Dies bedeutet, dass die Resultate gegebenenfalls nur für einen kleinen Teil der Bevölkerung zutreffen. Außerdem kann bei einer multifaktoriell bedingten Erkrankung schwer auf die eventuell protektive Wirkung eines einzelnen SNPs geschlossen werden, da sehr viele Faktoren die Ausprägung dieser Erkrankung beeinflussen. Han et al. fand 2015 ein 32% höheres Risiko an Parodontitis zu erkranken, wenn die *TLR4* 896G Mutation vorliegt. Bei anderen bakteriellen Infektionskrankheiten wie bei der *Helicobacter pylori* Infektion beeinflusst die missense-Variation rs4986790 (Asp299Gly) die Interaktion zwischen *TLR4* und bakteriellem LPS und begünstigt somit eine chronische Entzündung (Loganathan et al. 2017). Ähnliches könnte es sich auch bei der bakteriell bedingten chronischen Parodontitis abspielen, wodurch der Polymorphismus rs4986790 durchaus ein geeigneter Locus für eine Kandidatengenstudie zur chronischen Parodontitis zu sein scheint.

Dass sich in dieser Studie kein Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus rs4986790 und der chronischen Parodontitis finden lässt, könnte sich dadurch erklären, dass die Mutation Asp299Gly eventuell nur eine untergeordnete Bedeutung für die Pathogenese der chronischen Parodontitis hat. Gegebenenfalls müssten die an Parodontitis erkrankten Personen Homozygotie aufweisen, damit ein Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit Parodontitis zu entwickeln gegeben ist (Folwaczny et al. 2004).

### 6.5.2 Funktionelle Wirkung des Polymorphismus rs4263839 (Chromosom 9)

In dieser Studie zeigte sich kein Zusammenhang zwischen rs4263839 und der chronischen Parodontitis. Der Polymorphismus rs4263839 liegt im Gen für *TNFSF15*. *TNFSF15* Polymorphismen sind durch erhöhte Expression von TL1A mit verschiedenen autoimmun und entzündlich bedingten Erkrankungen assoziiert und beeinflussen unter anderem über den TL1A-DR3 Signalweg Th17-Zellen. Spezifische Th17-Zell-Marker wurden wiederum vermehrt in parodontalen Läsionen nachgewiesen (Adibrad et al. 2012). Th17-Zellen schütten das Zytokin IL-17 aus, welches die Entzündungsreaktion triggert und zu vermehrter Gewebeerstörung in der parodontalen Tasche führt (Garlet et al. 2010).

Die TL1A/DR3 Interaktion hat außerdem Auswirkungen auf T-Zellen und NK-Zellen und beeinflusst die B-Zell Proliferation (Cavallini et al. 2013). Im Rahmen der parodontalen Entzündungsreaktion spielen sowohl T-Zellen als auch B-Zellen eine Rolle. Eine vorwiegend Th1-Zell-vermittelte Immunantwort führt zur Produktion von IgG2 und Aktivierung der Phagozytose durch Makrophagen und Leukozyten, wodurch das Fortschreiten der Parodontitis eingedämmt wird. Ist die Läsion Th2-Zell dominiert, kommt es zu einer schwereren Ausprägung der Erkrankung, da weniger funktionell effektive Antikörper produziert werden (Gemmell et al. 2002, Gemmell et al. 1997). T-Zellen setzen außerdem IL-4 frei, was die Proliferation und Differenzierung von Antikörper produzierenden B-Zellen zur Folge hat (Sodek et al. 2006). TL1A wiederum reduziert die B-Zell-Proliferation und moduliert somit die Achse der angeborenen Immunantwort (Cavallini et al. 2013). Auch B-Zellen können in Zusammenhang mit Knochendestruktion im Rahmen der chronischen Parodontitis gebracht werden (Oliver-Bell et al. 2015).

Der TL1A/DR3 Signalweg hat Auswirkungen auf die zytokininduzierte Produktion von IFN- $\gamma$  in T-Zellen und NK-Zellen (Natürliche Killerzellen) (Papadakis et al. 2004). Die Anzahl an NK-Zellen in der parodontalen Tasche ist erhöht. IFN- $\gamma$  spielt eine Rolle bezüglich der Immunreaktion der chronischen Parodontitis und ist ein potenter Inhibitor von Interleukin 1, Tumornekrosefaktor und Lymphotoxin  $\alpha$ . Diese Zytokine sind im Rahmen der Immunabwehr im parodontalen Gewebe von Bedeutung (Kinane et al. 2001).

Der Polymorphismus rs4263839 könnte also bezogen auf die chronische Parodontitis immunmodulierenden Einfluss über Beeinträchtigung des TL1A/DR3 Signalweges

haben, denn dieser Signalweg ist auch bei anderen entzündlich bedingten Erkrankungen von Bedeutung.

Die Erkrankungen *M. Crohn*, biliäre Cholangitis und Lepra werden durch Polymorphismen des *TNFSF15* beeinflusst, wobei rs4263839 vermutlich eine regulatorische Rolle zukommt (Sun et al. 2016). Bei *M. Crohn* haben *NOD2*, das Rauchverhalten und *TNFSF15* Einfluss auf die Lokalisation der Erkrankung im Darm (Chen et al. 2011). Auch McGovern et al. beschreiben den Einfluss des Rauchverhaltens, des *TNFSF15*-Gens und anderer Gene auf *M. Crohn* (McGovern et al. 2006).

Bezüglich der Lepra wird vermutet, dass die Gene *NOD2*, *RIPK2* und *TNFSF15* Interferon- $\gamma$  regulieren (Zhang et al. 2009, Casanova et al. 2002). Interferon- $\gamma$  ist in fortgeschrittenen parodontalen Läsionen vermehrt nachzuweisen (Dutzan et al. 2009). Polymorphismen im *TNFSF15*-Gen beeinflussen sowohl Lepra als auch *M. Crohn*, was die Hypothese der Pleiotropie unterstreicht (Vaithilingam et al. 2014) und sie zu geeigneten Kandidaten macht, sie bezüglich der chronischen Parodontitis näher zu untersuchen.

*TNFSF15* ist assoziiert mit einer erhöhten IL-10 Produktion und einer Verschiebung von Th1- zur Th2-vermittelten Immunantwort (Zhang et al. 2009, Thiébaut et al. 2009). Dieser Vorgang spielt auch im Zuge der Immunreaktion bei der chronischen Parodontitis eine Rolle. Auch die Zytokine IL-10 und IFN- $\gamma$  wirken im Verlauf der parodontalen Entzündungsreaktion immunregulierend (Rateitschak et al. 2003). Somit könnte rs4263839 über IFN- $\gamma$ , IL-10 und durch den Wechsel von einer Th1- zu einer Th2-Immunantwort durchaus das Krankheitsbild der chronischen Parodontitis beeinflussen.

Der Polymorphismus rs4263839 könnte über *TNFSF15* auch den PI3K/Akt (*Phosphoinositid-3-Kinasen serine/threonine Kinase*) Signalweg modulieren, der im Zuge der entzündlichen Immunantwort und in der Pathogenese des Diabetes mellitus eine Rolle spielt (Engelman et al. 2006). Ligand von TNFRSF25 (*Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily Member 25*) durch *TNFSF15* (TL1A) führt zu Rekrutierung von TNFR (*Tumor Necrosis Factor Receptor*) assoziiertem Faktor 2 und TNFR assoziierter Death Domain in primären T-Zellen und anschließend zur Aktivierung von NF-kappa B und der PI3K/Akt Achse (*Phosphoinositid-3-Kinasen serine/threonine Kinase*) (Schreiber et al. 2013). Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3Ks) sind involviert in Prozesse des Zellwachstums, der Zellproliferation und des

Zellstoffwechsels, wie beispielsweise der Apoptose oder der Proteintranslation (Engelman et al. 2006).

Bezogen auf die chronische Parodontitis untersuchten Nakayama et al. 2015 den Einfluss von *Porphyromonas gingivalis* auf den PI3K/Akt Signalweg in gingivalen Epithelzellen. Dieses Bakterium schwächte den Signalweg durch die proteolytische Aktivität von Gingipain ab, wodurch PI3K/Akt abhängige Zellfunktionen dysreguliert und Epithelbarrieren zerstört wurden (Nakayama et al. 2015). Gingipain kann sowohl das Überleben von Zellen als auch die Apoptose über den PI3K/Akt Signalweg beeinflussen (Urnowey et al. 2006). Gingipaine sind Trypsin ähnliche Cystein-Proteinasen, die von *Porphyromonas gingivalis* produziert werden und mit dem Fortschreiten der chronischen Parodontitis assoziiert werden können (Imamura et al. 2003). Sollte rs4263839 über *TNFSF15* auch den PI3K/Akt Signalweg modulieren, könnte er somit Einfluss auf die Erkrankung der chronischen Parodontitis nehmen.

#### 6.5.3 Funktionelle Wirkung des Polymorphismus rs10758669 (Chromosom 9)

In der Allelfrequenz des Polymorphismus rs10758669 zeigte sich eine nominell signifikante Assoziation in der Gesamtpopulation.

Betrachtet man isoliert die Untergruppe der Raucher, tragen mehr rauchende Patienten das mutierte Allel C als die rauchenden Kontrollen. Dies könnte darauf hinweisen, dass Personen, die das mutierte Allel C tragen und zusätzlich rauchen, tendenziell häufiger an Parodontitis erkranken. Der Unterschied ist jedoch nicht signifikant ( $p=0,0544$ ).

Der Polymorphismus rs10758669 ist im Gen anzutreffen, das für *JAK2* (Janus Kinase 2) kodiert. Dieser Polymorphismus führt zu genetischer Instabilität und zu erhöhter Wahrscheinlichkeit von DNA Schäden. Er ist außerdem mit der Erkrankung *M. Crohn* assoziiert (Ferguson et al. 2010). Durch Nikotin und LPS kann es zu einer Phosphorylierung des *JAK2* von humanen Zellen des parodontalen Ligaments kommen (Bae et al. 2015), was einen möglichen Einfluss von rs10758669 und Rauchen bezogen auf die chronische Parodontitis unterstreicht.

*JAK2* und STAT3 sind eingebunden in ein Gennetzwerk des IL23/IL23-R (*Interleukin 23/ Interleukin 23-Rezeptor*) Signalwegs, welcher eine zentrale Rolle in der angeborenen und erworbenen Immunantwort, sowie bei Entzündungsreaktionen der Darmmukosa spielt (Brand 2009, Zhang et al. 2014). Bei *M. Crohn* wird vermutet, dass

rs10758669 über JAK2 die Funktion der epithelialen Barriere der Darmschleimhaut beeinträchtigen könnte, wobei der IL23/IL23-R Signalweg als möglicher Angriffspunkt diskutiert wird (Prager et al. 2012). Die IL23-R Immunantwort steht in Zusammenhang mit verschiedenen immunvermittelten Erkrankungen (Parkes et al. 2013). Die IL23/Th17 Achse beeinflusst die Pathogenese der zellvermittelten Gewebeerstörung, die durch die Immunreaktion auf eine bakterielle Infektion folgt, was deren Untersuchung auch bezogen auf die Parodontitis interessant macht (Saraiva et al. 2013). Ohyama et al. fanden 2009 erhöhte IL-23 und IL-17 Level in parodontalen Läsionen sowie ein verstärktes Auftreten von IL23R-Gen-Expression (Ohyama et al. 2009). Der JAK2/STAT3 Mechanismus ist beim IL23R-Signalweg in Th17 Zellen von Bedeutung. Im Zuge von entzündlich bedingten Erkrankungen sezernieren Th1-Zellen  $\gamma$ -IFN und machen somit das vaskuläre Endothel während der Entzündungsreaktion reaktiver für die Anheftung von intravaskulären Lymphozyten. So bekommen auch Th17-Zellen Zugang zum Gewebe und führen zu weiterer Zerstörung. Th17 ist beispielsweise verantwortlich für die Proliferation von Osteoklasten und spielt eine kritische Rolle beim Knochenabbau (Steinman et al. 2007). Ist der JAK2/STAT3 Signalweg durch rs10758669 beeinflusst, könnte dies somit auch Auswirkungen auf die Th17-Zell vermittelte Gewebedestruktion im Rahmen der chronischen Parodontitis haben. Th17 Zytokine werden als protektiv oder destruktiv bezogen auf die Erkrankung der chronischen Parodontitis diskutiert (Kramer et al. 2007).

Ein Zusammenhang zwischen Erkrankungen, die den Knochen betreffen, wie Osteoporose, rheumatoide Arthritis und Parodontitis, könnte über das Immunsystem und auch Th-17 Zellen vermittelt werden (Liu et al. 2017). Zwischen rheumatischer Arthritis und Parodontitis besteht eine epidemiologische Verbindung (Cheng et al. 2017). Im Mausmodell zur Erkrankung der Arthritis und dem Einfluss von Serotonin zeigte sich eine Relation zwischen dem erhöhten Wert an IL-17 und dem Vorkommen von Th17-Zellen in den Lymphknoten zusammen mit vermehrter Osteoklastendifferenzierung und stärkerer Knochenresorption (Chabbi-Achengli et al. 2016). Durch die Beeinflussung des JAK2/STAT3 Signalweges in Th17 Zellen scheint rs10758669 somit ein geeigneter Kandidat zu sein, um entzündlich induzierte Knochendefekte näher aufzuklären.

Der JAK/STAT Signalweg kann auch mit der Expression von Adhäsionsmolekülen, wie ICAM1 und VCAM1 in Verbindung gebracht werden (Duzagac et al. 2015), welche im Rahmen der parodontalen Entzündungsreaktion für die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten bedeutsam sind (Kinane et al. 2001). Bei Patienten mit der Immunerkrankung des Leukozytenadhäsionsdefekts, verursacht durch eine Mutation auf dem *ITGB2 Gen*, können beispielsweise neutrophile Granulozyten nicht in das periphere Gewebe eindringen. Der regulatorische Kreis wird unterbrochen und es kommt zu vermehrter Expression von IL-23 und IL-17, was wiederum zu Gewebeerstörung führt. Diese Patienten leiden häufig unter einer aggressiven Form der generalisierten Parodontitis mit pathologischem Knochenabbau (Hajishengallis et al. 2014), denn IL-17 induziert die Rezeptoraktivierung von RANKL auf Osteoblasten und führt somit zum Knochenabbau (Sato et al. 2006). Es wäre denkbar, dass der Polymorphismus rs10758669 durch die Beeinflussung des JAK/STAT Signalweges über ICAM1 Auswirkungen auf die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten nimmt und somit den Schweregrad der chronischen Parodontitis modulieren könnte.

#### 6.5.4 Funktionelle Wirkung der Polymorphismen rs2066844 und rs2066845 (Chromosom 16)

Für den Polymorphismus rs2066844 ergaben sich in vorliegender Studie keine Unterschiede in der Allelhäufigkeit oder der Genotypfrequenz zwischen den Studiengruppen und somit keine positiven Assoziationen zwischen dem Polymorphismus und der Erkrankung der chronischen Parodontitis. Die funktionelle Konsequenz dieses Polymorphismus ist eine Missense-Mutation oder eine Transkriptionsvariante. Diese *NOD2*-Variante konnte in eine Studie zu *M. Crohn* mit einer erhöhten funktionellen Aktivität von MBL-MASP (*Mannose-bindendes Lektin-Mannose-assoziierte-Serin-Protease*) in Zusammenhang gebracht werden. MBL-MASP spielt bei Entzündungsreaktionen eine Rolle indem es das Komplement-System aktiviert (Choteau et al. 2016). Sowohl bei *M. Crohn* als auch bei chronischer Parodontitis sind eine überschießende initiale Immunantwort von Bedeutung (Hajishengallis et al. 2015), weshalb ein Zusammenhang zwischen diesem Polymorphismus und der Erkrankung der chronischen Parodontitis denkbar ist.

In dieser Studie lässt sich auch für den Polymorphismus rs2066845 kein Zusammenhang mit der chronischen Parodontitis nachweisen. Das zugehörige Gen zu rs2066845 ist das *NOD2(G908R)* Gen (*Nucleotide binding oligomerisation domain 2*). Es konnte gezeigt werden, dass das Fehlen von NOD2-Rezeptoren den Knochenabbau vermindert. Im experimentellen Modell zur Parodontitis lässt dies die Vermutung zu, dass der NOD2-Rezeptor in das Voranschreiten des Knochenschwundes involviert ist. Die direkte Aktivierung des NOD2-Rezeptors durch MDP veränderte im Experiment zwar nicht die Osteoklastendifferenzierung, führte jedoch zu einer erhöhten Expression von Cathepsin K durch Osteoklasten. Cathepsin K ist eine Endoprotease, die zum Knochenabbau beiträgt. Die Aktivierung des NOD2-Rezeptors resultierte folglich in vermehrter Osteoklastenaktivität (Prates et al. 2014).

NOD2 erkennt unter anderem bakterielles MDP (*Muramyl Dipeptid*) (Inohara et al. 2003). MDP induziert die Produktion von Zytokinen und Chemokinen in gingivalen Fibroblasten, die NOD2 exprimieren und ist somit in die Pathogenese der chronischen Parodontitis involviert (Hosokawa et al. 2010). Durch MDP wird NOD2 stimuliert und induziert den NF-kappaB Signalweg, der zur Osteoklastogenese und daraus resultierend zu entzündlicher Osteolyse führt (Abu-Amer et al. 2013). Somit könnte der SNP rs2066845 einen Einfluss auf das Fortschreiten des alveolären Knochenrückganges im Verlauf einer parodontalen Erkrankung haben.

Der Polymorphismus rs2066845 führt zu einer ‚missense‘-Mutation oder einer Transkriptionsvariante. Es wird statt Glycin Arginin in das Genprodukt eingebaut. rs2066845 ist stark assoziiert mit *Morbus Crohn* (Schnitzler et al. 2015). NOD2 Mutationen, die zum Funktionsverlust führen (rs2066845 (G908R)), konnten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen in Verbindung gebracht werden. Indem NOD2 nicht aktiviert wird, ist die NF-kappaB Antwort vermindert und es kommt zu einer veränderten Regulation der IL-1 beta und IL-8 Produktion. Bezogen auf *Morbus Crohn* führen Fehler bei der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten, gesteuert durch NOD2 und IL-8 sowie durch die Verbindungen zwischen NOD2 und Toll-like-Rezeptor vermittelte Signalwege zu einer verminderten Aktivierung des Immunsystems (Härtel et al. 2016, Ogura et al. 2001, Hugot et al. 2001, MacArthur et al. 2012, van Heel et al. 2005). Fehlregulierte neutrophile Granulozyten spielen auch in der Pathogenese der chronischen Parodontitis eine Rolle (Nussbaum et al. 2011). Bei *Morbus Crohn* dominiert eine Th1-Typ Immunreaktion mit Überproduktion von IFN-γ (Interferon gamma). Diese Reaktion der Darmmukosa könnte aus einer gestörten



angeborenen Immunantwort mit abnormer Reaktion gegen normalerweise auftretende Antigene resultieren (Indriolo et al. 2011). In der Pathogenese der Parodontitis wurden unterschiedliche Wirtsantworten bei verschiedenen Levels der Erkrankung beobachtet. Diese reichen von der angeborenen Immunantwort (Charon et al. 1981), zu einer Lymphozytenantwort durch T- und B-Zellen (Afar et al. 1992, Celenligil et al. 1993), zur Expression verschiedener Zytokine durch Th-Zellen (T-Helferzellen) (Berglundh et al. 2002), zur Antigenerkennung durch T-Zell Rezeptoren, bis hin zu autoimmunen Reaktionen (Indriolo et al. 2011, Buduneli et al. 2011). Da die Immunantwort bei Parodontitis und *Morbus Crohn* sehr komplex ist, könnte der bei *Morbus Crohn* signifikant assoziierte Polymorphismus rs2066845 über das zugehörige Gen *NOD2* demnach einen modulierenden Einfluss auch auf die Parodontitis haben, basierend auf der Hypothese der Pleiotropie (Vaitilingham et al. 2014).

Eine weitere Erkrankung mit gemeinsamen prädisponierenden Faktoren hinsichtlich der chronischen Parodontitis, bei der auch Schäden am Endothel bedeutsam sind, ist die Arteriosklerose. Parodontitis wird als Risikofaktor für diese Krankheit diskutiert (Bartova et al. 2014). In Zusammenhang mit der ebenfalls chronisch entzündlich bedingten Erkrankung der Arteriosklerose konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass Tiere, die mit *P. gingivalis* infiziert waren und die ein fettreiches Futter bekamen, doppelt so viele arteriosklerotische Läsionen der Aorta aufwiesen wie Mäuse, die die gleiche Diät erhielten, jedoch nicht mit *P. gingivalis* infiziert waren (Amar et al. 2009). *NOD2* ist sowohl bei der Arteriosklerose als auch bei parodontalem Knochenabbau involviert. Im Mausmodell konnte ein Zusammenhang zwischen *NOD2* und Arteriosklerose sowie parodontalem Knochenabbau gefunden werden. Der Funktionsverlust von *NOD2* spielt eine bedeutende Rolle bezogen auf die schwere Parodontitis. Ein möglicher Mechanismus zur Entstehung der Arteriosklerose ist der Übergang von Bakterien in das Blut- und Lymphsystem. Die marginale Parodontitis hat das Potential, die Häufigkeit und den Schweregrad einer Bakteriämie zu beeinflussen. Die *NOD2* Funktion könnte eine Verbindung zwischen beiden Erkrankungen herstellen (Yuan et al. 2013).

#### 6.5.5 Interpretation der Haplotypenanalyse

Die Haplotypenanalyse auf Chromosom 9 ergab eine signifikante Assoziation für die Haplotypen AAA und AGC mit der chronischen Parodontitis, die sich jedoch nach Adjustierung hinsichtlich der Einflussfaktoren Alter, Geschlecht und Rauchen nicht aufrechterhalten ließ.

Alle drei untersuchten Polymorphismen auf Chromosom 9 konnten mit der Erkrankung *M. Cohn* in Verbindung gebracht werden. In Zusammenhang mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen haben sie einen Effekt auf die Th17-Zell-Entwicklung, indem sie bakterielle Produkte erkennen (*TLR4*), Th1- und Th17-Zellen kostimulieren (*TNFSF15*) oder eine Rolle bei der Differenzierung von Th-17 Zellen spielen (*JAK2*) (Brand et al. 2009).

Aufgrund der Hypothese der Pleiotropie (Vaithilingam et al. 2014) ist es denkbar, dass sich ähnliche Prozesse auch bei der chronischen Parodontitis abspielen. Auch dort scheinen Th17-Zellen und IL-17-Regulierung eine bedeutende Rolle inne zu haben, vor allem in Zusammenhang mit dem alveolären Knochenabbau (Chen et al. 2016, Cheng et al. 2014). So beeinflusst rs4263839 möglicherweise den Th17-Zell-Signalweg über eine vermehrte TL1A-Produktion. Auch rs10758660 könnte über die Modulierung von Signalwegen (*JAK2/STAT3*) in Th17-Zellen von Bedeutung sein. *TLR4* (rs4986790) erkennt mikrobielle Nukleinsäuren. Neutrophile Granulozyten versagen bei der Bekämpfung dieser dysbiotischen Bakterien, woraufhin Makrophagen, dendritische Zellen und T-Zellen wie Th17-Zellen, proinflammatorische Mediatoren wie IL 17 ausschütten. Diese Kaskade endet letztendlich in Gewebeerstörung (Hajishengallis et al. 2014).

Da alle drei Polymorphismen auf Genen liegen, die die Immunreaktion beeinflussen (Brand et al. 2009), scheint es möglich, dass der Haplotyp auf Chromosom 9, wenn alle drei Polymorphismen gleichzeitig eine funktionelle Auswirkung haben, die Entwicklung einer chronischen Parodontitis modulieren könnte.

Durch Adjustierung der Gesamtpopulation wurden mögliche Störfaktoren berücksichtigt und deren Einfluss entfernt. Die Ergebnisse der Haplotypenanalyse lassen sich nach Adjustierung bezüglich der Einflussfaktoren Alter, Geschlecht und Rauchverhalten nicht verifizieren. Die positive Assoziation lässt sich somit nicht auf eine einzelne genetische Ursache zurückführen. Bei genetisch komplexen Erkrankungen ist der

Einfluss von Umweltfaktoren von ätiologischer Bedeutung und oft notwendig, um die Krankheit überhaupt zu entwickeln. Beispielsweise könnte ein Individuum, das die genetische Prädisposition zur Erkrankung einer chronischen Parodontitis aufweist, dennoch phänotypisch gesund erscheinen, da es beispielsweise nicht raucht (Kinane et al. 2005, Johannsen et al. 2014). Möglicherweise könnten Patienten, welche die Haplotypen AAA oder AGC auf Chromosom 9 aufweisen, zwar ein genetisch höheres Risiko haben an chronischer Parodontitis zu erkranken, die Krankheit würde aber letztendlich nur dann in Erscheinung treten, wenn gleichzeitig ein Einfluss durch Umweltfaktoren besteht.

## 7 Zusammenfassung

Die fünf untersuchten Polymorphismen (rs4986790, rs4263839, rs10758669, rs2066845, rs2066844) wurden in genomweiten Assoziationsstudien als Kandidatengene für *Morbus Crohn* und *Colitis ulcerosa* identifiziert. Die chronische Parodontitis zeigt möglicherweise eine Überschneidung mit diesen chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Sie hat einen multifaktoriellen ätiologischen Hintergrund, wird durch Bakterien ausgelöst und sowohl durch Umweltfaktoren als auch durch genetische Einflüsse moduliert.

Ziel dieser Arbeit war es, die Assoziation dieser Polymorphismen, die auf Chromosom 9 (rs4986790, rs4263839, rs10758669) und auf Chromosom 16 (rs2066845, rs2066844) liegen, mit der chronischen Parodontitis zu prüfen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die genomische DNA von 587 gesunden Personen und 352 an chronischer Parodontitis erkrankten Studienteilnehmern mit kaukasischer Abstammung mit Hilfe der MALDI-TOF-Technik genotypisiert.

Für den Polymorphismus rs10758669 zeigte die statistische Auswertung der Allelverteilung der Gesamtpopulation ein nominell gerade noch signifikantes Ergebnis, das nach Bonferroni-Korrektur nicht erhalten bleibt.

Bei der Haplotypenanalyse des Chromosoms 9 konnte für die gemeinsame Betrachtung von rs4986790, rs4263839, rs10758669, die in der Einzelanalyse keine Signifikanz gezeigt hatten, eine signifikante Assoziation mit der chronischen Parodontitis für den Haplotyp AGC und AAA aufgezeigt werden. Nach Adjustierung hinsichtlich der Kovariablen Alter, Geschlecht und Rauchen fand sich kein signifikanter Unterschied mehr.

Diese Studie kann zusammenfassend keinen Zusammenhang zwischen den fünf untersuchten Polymorphismen und der Erkrankung der chronischen Parodontitis nachweisen.

## 8 Anhang

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
A. actinomycetemcomitans	Aggregatibacter actinomycetemcomitans
AIC	Akaike Information Kriterion
BOP	Bleeding on probing
C	Cytosin
ca.	Zirka
CEU	Central European Utah Residents
CI	Koinfidenzintervall
COX-2	Cyclooxygenase 2
D	Desequilibriumskoeffizienten
DMS	Deutsche Mundgesundheitsstudie
DNA	Desoxyribonucleic Acid
DR3	Death Receptor 3
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	et al.ii (und andere)
FG	Freiheitsgrade
FR	Frequenz
G	Guanin
GWAs	genomweite Assoziationsstudie
HWE	Hardy-Weinberg-Gleichgewicht
ICAM	interzelluläres Adhäsionsmolekül
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin

JAK	Janus Kinase
IL	Interleukin
IL-R	Interleukin Rezeptor
JAK	Janus Kinase
kB	kiloBasen
Ko	Kontrollgruppe
KuFR	kumulative Frequenz
LD	Linkage Disequilibrium
LPS	Lipopolysaccharid
MA	Minorallel
MAF	Minorallelfrequenz
MALDI TOF MS	matrix assisted laser desorption/ionisation off light mass spectrometry
MCP1	monocyte chemotactic protein 1
MDP	Muramyldipeptid
MHC	Haupthistonkompatibilitätskomplex
MMP	Matrixmetallpotease
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
NF-κB	Nuclear Factor kappa B
nl	Nanoliter
NLR	NOD like Rezeptor
NOD	Nucleotid bindende Oligomerisationsdomäne 2
NUG	nekrotisierend ulzerierende Formen der Gingivitis
NUP	nekrotisierend ulzerierende Formen der Parodontitis
°C	Grad Celcius
OPG	Osteoprotegerin

OR	Odds Ratio
P. gingivalis	Porphyromonas gingivalis
Pa	Parodontitisgruppe
PA	Parodontitis
PCR	Polymerasekettenreaktion
PMN	Polymorphkernige Granulozyten
RANK	Receptor Activator of Nuclear Factor kappa b
RANKL	RANK-Ligand
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
STAT	Signal Transducers an Activations of Transcription
T	Thymidin
TCR	T Zell Rezeptor
Th-Zellen	T-Helferzellen
TLA1	tumor necrosis factor like ligand 1
TLR4	Toll like Rezeptor 4
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
TNFSF	Tumor-Nekrose-Faktor-Liganden- Superfamilien Mitglied
TST	Taschensondierungstiefe
u.a.	unter anderem
VCAM	vaskuläres Zelladhesionsmolekül 1
z.B.	zum Beispiel
$\chi^2$	Chi-Quadrat

## 8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Tabelle zur Berechnung des Chi-Quadrat-Tests.....	38
Tabelle 2: Merkmale der Studienpopulation .....	42
Tabelle 3: rs498670 Exakter Test für Hardy-Weinberg- Gleichgewicht (n=915).....	43
Tabelle 4: rs4263839 Exakter Test für Hardy-Weinberg- Gleichgewicht (n=907).....	43
Tabelle 5: rs10758669 Exakter Test für Hardy-Weinberg- Gleichgewicht (n=897)....	44
Tabelle 6: rs2066845 Exakter Test für Hardy-Weinberg- Gleichgewicht (n=726).....	44
Tabelle 7: rs2066844 Exakter Test für Hardy-Weinberg- Gleichgewicht (n=914).....	44
Tabelle 8: SNP rs4986790: Prozentuale Verteilung der Genotypen (2x4Felder Chi-Quadrat-Test) und der Allele A und G in der Studienpopulation sowie zugehörige p-Werte. MA: Minorallel.....	45
Tabelle 9: Mögliche Vererbungsmodelle und Genotypfrequenz des SNP rs4986790 .	46
Tabelle 10: SNP rs4263839: Prozentuale Verteilung der Genotypen (2x4Felder Chi-Quadrat-Test) und der Allele G und A in der Studienpopulation sowie die zugehörigen p-Werte ,MA: Minorallel.....	47
Tabelle 11: Mögliche Vererbungsmodelle und Genotypfrequenz des SNP rs4263839 .	48
Tabelle 12: SNP rs10758669: Prozentuale Verteilung der Genotypen (2x4Felder Chi-Quadrat-Test) und der Allele A und C in der Studienpopulation sowie die zugehörigen p-Werte, MA: Minorallel.....	49
Tabelle 13: Mögliche Vererbungsmodelle und Genotypfrequenz des SNP rs10758669	50
Tabelle 14: SNP rs2066845: Prozentuale Verteilung der Genotypen (2x4Felder Chi-Quadrat-Test) und Allele C und G in der Studienpopulation sowie die zugehörigen p-Werte, MA: Minorallel.....	51
Tabelle 15: Mögliche Vererbungsmodelle und Genotypfrequenz des SNP rs2066845 .	52
Tabelle 16: SNP rs2066844: Prozentuale Verteilung der Genotypen (2x4Felder Chi-Quadrat-Test) und der Allele C und T in der Studienpopulation sowie die zugehörigen p-Werte. MA: Minorallel.....	53
Tabelle 17: Mögliche Vererbungsmodelle und Genotypfrequenz des SNP rs2066844 .	54
Tabelle 18: SNP rs4986790: Prozentuale Verteilung der Genotypen (2x4Felder Chi-Quadrat-Test) und der Allele A und G in der Studienpopulation in Abhängigkeit vom Geschlecht (Männer) sowie die zugehörigen p-Werte MA: Minorallel.....	55



Tabelle 19: SNP rs4986790: Prozentuale Verteilung der Genotypen (2x4Felder Chi-Quadrat-Test) und der Allele A und G in der Studienpopulation in Abhängigkeit vom Geschlecht (Frauen) sowie die zugehörigen p-Werte. MA: Minorallel.....	56
Tabelle 20: SNP rs4263839: Prozentuale Verteilung der Genotypen (2x4Felder Chi-Quadrat-Test)und der Allele G und A in der Studienpopulation in Abhängigkeit vom Geschlecht (Männer) sowie die zugehörigen p-Werte MA: Minorallel.....	57
Tabelle 21: SNP rs4263839: Prozentuale Verteilung der Genotypen (2x4Felder Chi-Quadrat-Test) und der Allele G und A in der Studienpopulation in Abhängigkeit vom Geschlecht (Frauen) sowie die zugehörigen p-Werte. MA: Minorallel.....	57
Tabelle 22: SNP rs10758669: Prozentuale Verteilung der Genotypen (2x4Felder Chi-Quadrat-Test) und der Allele A und C in der Studienpopulation in Abhängigkeit vom Geschlecht (Männer) sowie die zugehörigen p-Werte. MA: Minorallel.....	58
Tabelle 23: SNP rs10758669: Prozentuale Verteilung der Genotypen (2x4Felder Chi-Quadrat-Test)und der Allele A und C in der Studienpopulation in Abhängigkeit vom Geschlecht (Frauen) sowie die zugehörigen p-Werte. MA: Minorallel.....	59
Tabelle 24: SNP rs2066845: Prozentuale Verteilung der Genotypen (2x4Felder Chi-Quadrat-Test) und Allele C und G in der Studienpopulation in Abhängigkeit vom Geschlecht (Männer) MA: Minorallel .....	60
Tabelle 25: SNP rs2066845: Prozentuale Verteilung der Genotypen (2x4Felder Chi-Quadrat-Test) und Allele C und G in der Studienpopulation in Abhängigkeit vom Geschlecht (Frauen) MA: Minorallel .....	61
Tabelle 26: SNP rs2066844: Prozentuale Verteilung der Genotypen (2x4Felder Chi-Quadrat-Test) und der Allele C und T in der Studienpopulation in Abhängigkeit vom Geschlecht (Männer). Sowie die zugehörigen p-Werte. MA: Minorallel.....	62
Tabelle 27: SNP rs2066844: Prozentuale Verteilung der Genotypen (2x4Felder Chi-Quadrat-Test)und der Allele C und T in der Studienpopulation in Abhängigkeit vom Geschlecht (Frauen) sowie die zugehörigen p-Werte. MA: Minorallel.....	63

Tabelle 28: SNP rs4986790: Prozentuale Verteilung der Genotypen (2x4Felder Chi-Quadrat-Test) und der Allele A und G in der Studienpopulation in Abhängigkeit vom Nikotinabusus (Nichtraucher) sowie die zugehörigen p-Werte. MA: Minorallel.....	64
Tabelle 29: SNP rs4986790: Prozentuale Verteilung der Genotypen (2x4Felder Chi-Quadrat-Test) und der Allele A und G in der Studienpopulation in Abhängigkeit vom Nikotinabusus (Raucher) sowie die zugehörigen p-Werte. MA: Minorallel.....	65
Tabelle 30: SNP rs4263839: Prozentuale Verteilung der Genotypen (2x4Felder Chi-Quadrat-Test) und der Allele G und A in der Studienpopulation in Abhängigkeit vom Nikotinabusus (Nichtraucher) sowie die zugehörigen p-Werte. MA: Minorallel.....	66
Tabelle 31: SNP rs4263839: Prozentuale Verteilung der Genotypen (2x4Felder Chi-Quadrat-Test) und der Allele G und A in der Studienpopulation in Abhängigkeit vom Nikotinabusus (Raucher) sowie die zugehörigen p-Werte. MA: Minorallel.....	66
Tabelle 32: SNP rs10758669: Prozentuale Verteilung der Genotypen (2x4Felder Chi-Quadrat-Test) und der Allele A und C in der Studienpopulation in Abhängigkeit vom Nikotinabusus (Nichtraucher) sowie die zugehörigen p-Werte. MA: Minorallel.....	67
Tabelle 33: SNP rs10758669: Prozentuale Verteilung der Genotypen(2x4Felder Chi-Quadrat-Test) und der Allele A und C in der Studienpopulation in Abhängigkeit vom Nikotinabusus (Raucher) sowie die zugehörigen p-Werte. MA: Minorallel.....	68
Tabelle 34: SNP rs2066845: Prozentuale Verteilung der Genotypen (2x4Felder Chi-Quadrat-Test) und Allele C und G in der Studienpopulation in Abhängigkeit vom Nikotinabusus (Nichtraucher) MA: Minorallel .....	69
Tabelle 35: SNP rs2066845: Prozentuale Verteilung der Genotypen (2x4Felder Chi-Quadrat-Test) und Allele C und G in der Studienpopulation in Abhängigkeit vom Nikotinabusus (Raucher) MA: Minorallel.....	70
Tabelle 36: SNP rs2066844: Prozentuale Verteilung der Genotypen (2x4Felder Chi-Quadrat-Test) und der Allele C und T in der Studienpopulation in Abhängigkeit vom Nikotinabusus (Nichtraucher) sowie die zugehörigen p-Werte. MA: Minorallel.....	71

Tabelle 37: SNP rs2066844: Prozentuale Verteilung der Genotypen (2x4Felder Chi-Quadrat-Test) und der Allele C und T in der Studienpopulation in Abhängigkeit vom Nikotinabusus (Raucher) sowie die zugehörigen p-Werte. MA: Minorallel .....	72
Tabelle 38: Likelihood-Quotienten-Tests .....	73
Tabelle 39: D' Statistik und R Statistik für die Kopplungsungleichgewichtsanalyse der SNP auf Chromosom 9 .....	74
Tabelle 40: D' Statistik und R Statistik für die Kopplungsungleichgewichtsanalyse der SNP auf Chromosom 16 .....	74
Tabelle 41: Haplotyp-Frequenz-Schätzung Chromosom 9(n=922) Pa: Parodontitisgruppe, Ko: Kontrollgruppe, Ku.Fr: kumulative Frequenz .....	75
Tabelle 42: Haplotyp-Frequenz-Schätzung Chromosom 16 (n=917) Pa: Parodontitisgruppe, Ko: Kontrollgruppe, Ku Fr: kumulative Frequenz .....	76
Tabelle 43: Haplotypassoziation mit Antwort (n=922, unbearbeitete Analyse) Freq: Frequenz, OR: Odds ratio, CI: Koinfidenzintervall .....	76
Tabelle 44: Haplotypassoziation mit Antwort (n=639, angepasst an Alter, Geschlecht, Rauchen) Freq: Frequenz, OR: Odds ratio, CI: Koinfidenzintervall.....	77
Tabelle 45: Haplotypassoziation mit Antwort (n=917, unbearbeitete Analyse) Freq: Frequenz, OR: Odds Ratio, CI: Koinfidenzintervall.....	78
Tabelle 46: Haplotypassoziation mit Antwort (n=635, angepasst an Alter, Geschlecht, Rauchen) Freq: Frequenz, OR: Odds Ratio, CI: Koinfidenzintervall .....	78
Tabelle 47: Vergleich der Allelfrequenzen der eigenen Kontrollgruppe mit der CEU-Population, der Franke et al., Waterman et al., Barrett et al., Browning et al. Kohorte. MA: Minorallel .....	88
Tabelle 48: Genotyp-Frequenzvergleich zwischen eigener Kontrollgruppe und der CEU Population .....	89

### 8.3 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: TLR-Signalwege bei Säugetieren. *TLR4* ist sowohl an der Zelloberfläche lokalisiert, als auch am Endosom, wo mikrobielle Nukleinsäuren erkannt werden können. Die TLR Signalwege enden in der Aktivierung von Nuklear Faktor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), Interferon-reguierenden Faktoren (IRFs), Zyklischem AMP-responsivem Element-bindendem Protein (CREB) und Aktivator Protein 1 (AP1) (O'Neill et al. 2013). dsRNA: doublestranded RNA, IKK: Inhibitor of NF- $\kappa$ B Kinase, LPS: Lipopolysaccharid, MKK: MAP Kinase Kinase, RIP1: Rezeptor.interagierendes Protein1, rRNA: ribosomale RNA, ss RNA: single-stranded RNA, TAB: Tak1 bindendes Protein, TAK: TGF $\beta$  aktivierte Kinase, TBK1: TANK bindende Kinase 1 (Bildquelle O'Neill et al. 2013, modifiziert). ..... 20
- Abbildung 2: TL1A verbindet die angeborene Immunantwort mit der erworbenen Immunantwort und kann autoimmun bedingte oder entzündliche Erkrankungen induzieren (Bildquelle Aiba et al. 2013, modifiziert). .... 22
- Abbildung 3: Assoziation zwischen Komponenten der IL-23R Immunantwort mit immun-vermittelten Erkrankungen. Viele Komponenten der Interleukin 23 Rezeptor (IL-23R) Immunantwort zeigen genomweite Assoziation mit einer Reihe von immun-vermittelten Erkrankungen hier im Kontext zu Th1- und Th17-Zellen dargestellt (Parkes et al. 2013). CARD9: caspase recruitment domain-containing preotein 9, CCR6: CC Chemokin Rezeptor 6, IFN $\gamma$ : Interferon  $\gamma$ , JAK2: Janus Kinase 2, NF- $\kappa$ B: Nuclear factor  $\kappa$ B, PTGER4: Prostaglandin E 2 Rezeptor EP4 Subtyp, STAT3: signal transducer and activator of transcription 3, TYK2: Tyrosin Kinase 2 (Bildquelle: Parkes et al. 2013, modifiziert). ..... 24
- Abbildung 4: Signalwege von NOD1 und NOD2. Erkennung von Muramyl-Dipeptid (MDP) und  $\gamma$ -D-glutamyl-meso-diaminopimelic Acid (iE-DAP) durch die leucinreiche Repeat Domäne (LRR) aktiviert die NOD (nukleotid-bindende Oligomerisationsdomäne) Proteine NOD1 und NOD2, wodurch Rezeptor-interagierende serine/threonine Kinase (RICK) durch caspase-recruitment Domäne (CARD)-CARD Interaktionen rekrutiert wird. Bei NOD2 führt die Aktivierung von RICK zu K63 (Lys63)-verbundenen Polyubiquitylation von IKK $\gamma$  (I $\kappa$ B Kinase gamma). Es folgt die

Phosphorylierung von IKK $\beta$ (I $\kappa$ B Kinase beta) und I $\kappa$ B sowie die Freisetzung von NF- $\kappa$ B für die Translokation in den Zellkern (Stober et al. 2006). AP1: Aktivator Protein 1, PGN: Peptidoglykan (Bildquelle Strober et al. 2006, modifiziert).....	28
---	----

## 9 Literaturverzeichnis

Abdollahi-Roodsaz S<sup>1</sup>, Joosten LA, Koenders MI, Devesa I, Roelofs MF, Radstake TR, Heuvelmans-Jacobs M, Akira S, Nicklin MJ, Ribeiro-Dias F, van den Berg WB. Stimulation of TLR2 and TLR4 differentially skews the balance of T cells in a mouse model of arthritis. *J Clin Invest*. 2008 Jan;118(1):205-16.

Abu-Amer Y1. NF-κB signaling and bone resorption. *Osteoporos Int*. 2013 Sep;24(9):2377-86

Academy Report: Research, Science and Therapy Committee of the American Academy of Periodontology: Epidemiology of Periodontal Disease, *J Periodontol* 2005, 76: 1406-1419

Adibrad M1, Deyhimi P, Ganjalikhani Hakemi M, Behfarnia P, Shahabuei M, Rafiee L. Signs of the presence of Th17 cells in chronic periodontal disease. *J Periodontal Res*. 2012 Aug;47(4):525-31

Afar B1, Engel D, Clark EA. Activated lymphocyte subsets in adult periodontitis *J Periodontal Res*. 1992 Mar;27(2):126-33.

Agnese DM1, Calvano JE, Hahm SJ, Coyle SM, Corbett SA, Calvano SE, Lowry SF. Human toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-negative infections. *J Infect Dis*. 2002 Nov 15;186(10):1522-5

Agossa K1,2, Dendooven A3, Dubuquoy L3, Gower-Rousseau C3,4, Delcourt-Debruyne E5,6, Capron M3. Periodontal manifestations of inflammatory bowel disease: emerging epidemiologic and biologic evidence. *J Periodontal Res*. 2016 Sep 24 doi: 10.1111/jre.12422. [Epub ahead of print]

Aiba Y1, Nakamura M2. The role of TL1A and DR3 in autoimmune and inflammatory diseases. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:258164

Akaike, Hirotugu: Information theory and an extension of the maximum likelihood principle. In: B. N. Petrov (Hrsg.) u.A.: Proceedings of the Second International Symposium on Information Theory Budapest: Akademiai Kiado 1973. S. 267-281

- Albandar JM. Periodontol 2000. Aggressive periodontitis: case definition and diagnostic criteria. 2014 Jun;65(1):13-26.
- Amar S1, Wu SC, Madan M. Is Porphyromonas gingivalis cell invasion required for atherogenesis? Pharmacotherapeutic implications. J Immunol. 2009 Feb 1;182(3):1584-92.
- Amano A1. Disruption of epithelial barrier and impairment of cellular function by Porphyromonas gingivalis. Front Biosci. 2007 May 1;12:3965-74.
- Anderson CA, Boucher G, Lees CW, Franke A, D'Amato M, Taylor KD, Lee JC, Goyette P, Imielinski M, Latiano A, Lagacé C, Scott R, Amininejad L, Bumpstead S, Baidoo L, Baldassano RN, Barclay M, Bayless TM, Brand S, Büning C, Colombel JF, Denson LA, De Vos M, Dubinsky M, Edwards C, Ellinghaus D, Fehrmann RS, Floyd JA, Florin T, Franchimont D, Franke L, Georges M, Glas J, Glazer NL, Guthery SL, Haritunians T, Hayward NK, Hugot JP, Jobin G, Laukens D, Lawrance I, Lémann M, Levine A, Libioulle C, Louis E, McGovern DP, Milla M, Montgomery GW, Morley KI, Mowat C, Ng A, Newman W, Ophoff RA, Papi L, Palmieri O, Peyrin-Biroulet L, Panés J, Phillips A, Prescott NJ, Proctor DD, Roberts R, Russell R, Rutgeerts P, Sanderson J, Sans M, Schumm P, Seibold F, Sharma Y, Simms LA, Seielstad M, Steinhart AH, Targan SR, van den Berg LH, Vatn M, Verspaget H, Walters T, Wijmenga C, Wilson DC, Westra HJ, Xavier RJ, Zhao ZZ, Ponsioen CY, Andersen V, Torkvist L, Gazouli M, Anagnou NP, Karlsen TH, Kupcinskis L, Sventoraityte J, Mansfield JC, Kugathasan S, Silverberg MS, Halfvarson J, Rotter JI, Mathew CG, Griffiths AM, Gearry R, Ahmad T, Brant SR, Chamaillard M, Satsangi J, Cho JH, Schreiber S, Daly MJ, Barrett JC, Parkes M, Annese V, Hakonarson H, Radford-Smith G, Duerr RH, Vermeire S, Weersma RK, Rioux JD. Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. Nat Genet. 2011 Mar;43(3):246-52
- Angeletti S1, Dicuonzo G1, D'Agostino A1, Avola A1, Crea F1, Palazzo C1, Dedej E1, De Florio L1. Turnaround time of positive blood cultures after the introduction of matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry. New Microbiol. 2015 Jul;38(3):379-86

- Armitage G. Classifying periodontal diseases – a longstanding dilemma. *Periodontol* 2000, 2002;30:9-23
- Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 1999;4:1-6
- Asimit J, Zeggini E. Rare variant association analysis methods for complex traits. *Annu Rev Genet.* 2010;44:293–308.
- Bae WJ<sup>1</sup>, Shin MR<sup>2</sup>, Kang SK<sup>3</sup>, Zhang-Jun<sup>1</sup>, Kim JY<sup>1</sup>, Lee SC<sup>4</sup>, Kim EC<sup>1</sup> HIF-2 Inhibition Suppresses Inflammatory Responses and Osteoclastic Differentiation in Human Periodontal Ligament Cells. *J Cell Biochem.* 2015 Jul;116(7):1241-55
- Bahrami G<sup>1</sup>, Vaeth M<sup>2</sup>, Kirkevang LL<sup>3,4</sup>, Wenzel A<sup>3</sup>, Isidor F<sup>5</sup>. The impact of smoking on marginal bone loss in a 10-year prospective longitudinal study. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2016 Sep 21. doi: 10.1111/cdoe.12260. [Epub ahead of print]
- Bamias G<sup>1</sup>, Martin C 3rd, Marini M, Hoang S, Mishina M, Ross WG, Sachedina MA, Friel CM, Mize J, Bickston SJ, Pizarro TT, Wei P, Cominelli F. Expression, localization, and functional activity of TL1A, a novel Th1-polarizing cytokine in inflammatory bowel disease. *J Immunol.* 2003 Nov 1;171(9):4868-74.
- Barrett Jeffrey C, Hansoul Sarah, Nicolae Dan L, Cho Judy H et al.. 2008: Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nature Genetics* Vol. 40, Number 8, August 2008
- Bartold Mark P., Cantley Melissa D., Haynies David R. 2010. Mechanisms and control of pathologic bone loss in periodontitis. *Periodontology* 2000, Vol. 54, 2010, 136-159
- Barton GM, Medzhitov R, Toll-like receptor signalling pathways. *Science* 2003,300,1524-1525
- Bartova J<sup>1</sup>, Sommerova P<sup>1</sup>, Lyuya-Mi Y<sup>1</sup>, Mysak J<sup>1</sup>, Prochazkova J<sup>1</sup>, Duskova J<sup>1</sup>, Janatova T<sup>1</sup>, Podzimek S<sup>1</sup> Periodontitis as a risk factor of atherosclerosis. *J Immunol Res.* 2014;2014:636893. doi: 10.1155/2014/636893. Epub 2014 Mar 23.



- Beckmann JS<sup>1</sup>, Estivill X, Antonarakis SE. Copy number variants and genetic traits: closer to the resolution of phenotypic to genotypic variability. *Nat Rev Genet*. 2007 Aug;8(8):639-46.
- Begum F<sup>1</sup>, Ghosh D, Tseng GC, Feingold E. Comprehensive literature review and statistical considerations for GWAS meta-analysis. *Nucleic Acids Res*. 2012 May;40(9):3777-84
- Bentley RW<sup>1</sup>, Pearson J, Gearry RB, Barclay ML, McKinney C, Merriman TR, Roberts RL. Association of higher DEFB4 genomic copy number with Crohn's disease. *Am J Gastroenterol*. 2010 Feb;105(2):354-9.
- Berglundh T<sup>1</sup>, Liljenberg B, Lindhe J. Some cytokine profiles of T-helper cells in lesions of advanced periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2002 Aug;29(8):705-9.
- Bergström J, Cigarette smoking as risk factor in chronic periodontal disease. *Community Dent Oral Epidemiol* 1989, 17, 245-247
- Bezerra<sup>1</sup> Beatriz de Brito Enilson Antônio Sallum<sup>2</sup> Antônio Wilson Sallum<sup>2</sup> Obesity and periodontal disease: why suggest such relationship? An overview Brazilian *Journal of Oral Sciences*, Vol. 6, No. 23, October-December, 2007, pp. 1420-1422
- Bickeböller,H, C.F, Einführung in die genetische Epidemiologie, ed. Springer Verlag, 2007
- Bouma G<sup>1</sup>, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol*. 2003 Jul;3(7):521-33.
- Brand S<sup>1</sup>. Crohn's disease: Th1, Th17 or both? The change of a paradigm: new immunological and genetic insights implicate Th17 cells in the pathogenesis of Crohn's disease. *Gut*. 2009 Aug;58(8):1152-67.
- Brandtzaeg P<sup>1</sup>. Inflammatory bowel disease: clinics and pathology. Do inflammatory bowel disease and periodontal disease have similar immunopathogeneses? *Acta Odontol Scand*. 2001 Aug;59(4):235-43.
- Bray MS<sup>1</sup>, Boerwinkle E, Doris PA. High-throughput multiplex SNP genotyping with MALDI-TOF mass spectrometry: practice, problems and promise. *Hum Mutat*. 2001 Apr;17(4):296-304.

- Brito F1, de Barros FC, Zaltman C, Carvalho AT, Carneiro AJ, Fischer RG, Gustafsson A, Figueredo CM. Prevalence of periodontitis and DMFT index in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *J Clin Periodontol*. 2008 Jun;35(6):555-60.
- Brito F<sup>1</sup>, Zaltman C, Carvalho AT, Fischer RG, Persson R, Gustafsson A, Figueredo CM. Subgingival microflora in inflammatory bowel disease patients with untreated periodontitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2013 Feb;25(2):239-45.
- Breen G<sup>1</sup>. Practical informatics approaches to microsatellite and variable number tandem repeat analysis. *Methods Mol Biol*. 2010;628:181-94.
- Browning BL1, Huebner C, Petermann I, Gearry RB, Barclay ML, Shelling AN, Ferguson LR. Has toll-like receptor 4 been prematurely dismissed as an inflammatory bowel disease gene? Association study combined with meta-analysis shows strong evidence for association. *Am J Gastroenterol*. 2007 Nov;102(11):2504-12
- Buduneli N1, Kinane DF. Host-derived diagnostic markers related to soft tissue destruction and bone degradation in periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2011 Mar;38 Suppl 11:85-105
- Burtis Carl A., Ashwood Edward R., Burgns David E. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. Elsevier Health Sciences 2012
- Buselmaier W, Tariverdian G, *Humangenetik*, 4. Auflage 2007 Springer Verlag
- Cardon LR1, Bell JI. Association study designs for complex diseases. *Nat Rev Genet*. 2001 Feb;2(2):91-9.
- Cardon LR1, Palmer LJ. Population stratification and spurious allelic association. *Lancet*. 2003 Feb 15;361(9357):598-604.
- Casanova JL1, Abel L. Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the human model. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:581-620
- Cavallini C1, Lovato O, Bertolaso A, Pacelli L, Zoratti E, Zanolin E, Krampera M, Zamò A, Tecchio C, Cassatella MA, Pizzolo G, Scupoli MT. The TNF-family cytokine TL1A inhibits proliferation of human activated B cells. *PLoS One*. 2013;8(4):e60136

- Cekici A, Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol* 2000 2014 Feb;64(1):57-80
- Celenligil H1, Kansu E, Ruacan S, Eratalay K, Caglayan G. In situ characterization of gingival mononuclear cells in rapidly progressive periodontitis. *J Periodontol*. 1993 Feb;64(2):120-7.
- Chabbi-Achengli Y1, Coman T2, Collet C3, Callebert J4, Corcelli M1, Lin H1, Rignault R5, Dy M5, de Vernejoul MC6, Côté F7. Serotonin Is Involved in Autoimmune Arthritis through Th17 Immunity and Bone Resorption. *Am J Pathol* 2016, Apr, 186 (4):927-37
- Chai L, Song, Y-Q, Zee K-Y, Leung W.K SNPs of Fc-gamma Receptor Genes and Chronic Periodontitis. *J Dent Res* 89(7): 705-710, 2010
- Charon J, Toto PD, Gargiulo AW. Activated macrophages in human periodontitis. *J Periodontol*. 1981 Jun;52(6):328-35.
- Chen H1, Lee A, Bowcock A, Zhu W, Li E, Ciorba M, Hunt S. Influence of Crohn's disease risk alleles and smoking on disease location. *Dis Colon Rectum*. 2011 Aug;54(8):1020-5
- Chen XT<sup>1,2</sup>, Chen LL<sup>1</sup>, Tan JY<sup>1</sup>, Shi DH<sup>1</sup>, Ke T<sup>1</sup>, Lei LH<sup>1</sup>. Th17 and Th1 Lymphocytes Are Correlated with Chronic Periodontitis. *Immunol Invest*. 2016;45(3):243-54
- Cheng WC<sup>1</sup>, Hughes FJ, Taams LS. The presence, function and regulation of IL-17 and Th17 cells in periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2014 Jun;41(6):541-9.
- Cheng Z<sup>1</sup>, Meade J<sup>1</sup>, Mankia K<sup>2</sup>, Emery P<sup>2</sup>, Devine DA<sup>3</sup>. Periodontal disease and periodontal bacteria as triggers for rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2017 Feb;31(1):19-30.
- Cherkaoui A1, Hibbs J, Emonet S, Tangomo M, Girard M, Francois P, Schrenzel J. Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level. *J Clin Microbiol*. 2010 Apr;48(4):1169-75.

- Cho, J. H., Nicolae, D. L., Gold, L. H., Fields, C. T., LaBuda, M. C., Rohal, P. M., Pickles, M. R., Qin, L., Fu, Y., Mann, J. S., Kirschner, B. S., Jabs, E. W., Weber, J., Hanauer, S. B., Bayless, T. M., Brant, S. R. Identification of novel susceptibility loci for inflammatory bowel disease on chromosomes 1p, 3q, and 4q: evidence for epistasis between 1p and IBD1. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 95: 7502-7507, 1998
- Choteau L<sup>1,2,3</sup>, Vasseur F<sup>4</sup>, Lepretre F<sup>5</sup>, Figeac M<sup>5</sup>, Gower-Rousseau C<sup>1,2</sup>, Dubuquoy L<sup>1,2</sup>, Poulain D<sup>1,2,3</sup>, Colombel JF<sup>6</sup>, Sendid B<sup>1,2,3</sup>, Jawhara S<sup>1,2,3</sup>. Polymorphisms in the Mannose-Binding Lectin Gene are Associated with Defective Mannose-Binding Lectin Functional Activity in Crohn's Disease Patients. *Sci Rep.* 2016 Jul 12;6:29636.
- Chung CS, Kau MCW, Chung SSC, Rao DC. 1977. A genetic and epidemiologic study of periodontal disease in Hawaii II. Genetic and environmental influence. *Am J Hum Genet* 1977; 29; 76-82
- Clark AG<sup>1</sup>, Boerwinkle E, Hixson J, Sing CF. Determinants of the success of whole-genome association testing. *Genome Res.* 2005 Nov;15(11):1463-7.
- Cochran DL 2008, Inflammation and bone loss in periodontal disease *J Periodontol* 2008, 79,(8Suppl.), 1569-1576
- Colhoun, Helen M, Mc Keigue Paul, Davey Smith George, Problems of reporting genetic associations with complex outcomes. *The Lancet* Vol 361, March 8, 2003, 865-72
- Corey LA, Nance WE, Hofstede P, Schenkein HA: Self-reported periodontal disease in a Virginia twin population. 1993, *J Periodontol*, 64, 1205-1208
- Craddock N, Hurles ME, Cardin N et al. 2010, Genome-wide association study of CNVs in 16000 cases of eight common diseases and 3000 shared controls. *Nature* 464(7289):713-720
- Croft M1. The role of TNF superfamily members in T-cell function and diseases. *Nat Rev Immunol.* 2009 Apr;9(4):271-85

- Cutler CW<sup>1</sup>, Jotwani R. Antigen-presentation and the role of dendritic cells in periodontitis. *Periodontol* 2000. 2004;35:135-57.
- Da Silva Furtado Amaral Cristine, Vettore Mario Vianna, Leao Anna, The relationship of alcohol dependence and alcohol consumption with periodontitis: A systematic review, *Journal of dentistry* 37, 2009, 643-651
- de Souza HS<sup>1</sup>, Fiocchi C<sup>2</sup>. Immunopathogenesis of IBD: current state of the art. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2016 Jan;13(1):13-27.
- Detera-Wadleigh SD<sup>1</sup>, McMahon FJ. Genetic association studies in mood disorders: issues and promise. *Int Rev Psychiatry*. 2004 Nov;16(4):301-10.
- Díaz-Zúñiga J<sup>1</sup>, Monasterio G, Alvarez C, Melgar-Rodríguez S, Benítez A, Ciuchi P, García M, Arias J, Sanz M, Vernal R. Variability of the dendritic cell response triggered by different serotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* or *Porphyromonas gingivalis* is toll-like receptor 2 (TLR2) or TLR4 dependent. *J Periodontol*. 2015 Jan;86(1):108-19.
- Dinarello CA<sup>1</sup>. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood*. 1991 Apr 15;77(8):1627-52.
- DMS V Fünfte Deutsche Mundgesundheitsstudie  
[https://www.bzaek.de/fileadmin/PDFs/dms/Zusammenfassung\\_DMS\\_V.pdf](https://www.bzaek.de/fileadmin/PDFs/dms/Zusammenfassung_DMS_V.pdf)
- Duzagac F<sup>1</sup>, Inan S, Ela Simsek F, Acikgoz E, Guven U, Khan SA, Rouhrazi H, Oltulu F, Aktug H, Erol A, Oktem G. JAK/STAT pathway interacts with intercellular cell adhesion molecule (ICAM) and vascular cell adhesion molecule (VCAM) while prostate cancer stem cells form tumor spheroids. *J BUON*. 2015 Sep-Oct;20(5):1250-7.
- Dutzan N<sup>1</sup>, Vernal R, Hernandez M, Dezerega A, Rivera O, Silva N, Aguillon JC, Puente J, Pozo P, Gamonal J. Levels of interferon-gamma and transcription factor T-bet in progressive periodontal lesions in patients with chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2009 Feb;80(2):290-6
- Edwards JR<sup>1</sup>, Ruparel H, Ju J. Mass-spectrometry DNA sequencing. *Mutat Res*. 2005 Jun 3;573(1-2):3-12.

- Elston RC<sup>1</sup>, Lin D, Zheng G. Multistage sampling for genetic studies *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2007;8:327-42.
- Engelman JA<sup>1</sup>, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet.* 2006 Aug;7(8):606-19.
- Fahrmeier, Künstler, Pigeot, Tutz. Statistik. Der Weg zur Datenanalyse, 7. Auflage, Springer Verlag, 2011
- Feng Z, Weinberg A 2006. Role of bacteria in health and disease of periodontal tissues. *Periodontol* 2000, 2006, 40, 50-76
- Feller L<sup>1</sup>, Wood NH, Raubenheimer E. Complex oral manifestations of an HIV-seropositive patient. *J Int Acad Periodontol.* 2006 Jan;8(1):10-6.
- Ferguson Lynette F., Han Dug Yeo, Fraser Alan G., Huebner Claudia, Lam Wen Jiun, Morgan Angharad R., Duan He, Karunasinghe Nishi 2010. Genetic factors in chronic inflammation: Single nucleotide polymorphisms in the STAT-JAK pathway, susceptibility to DNA damage and Crohn's disease in a New Zealand population. *Mutation Research* 690 (2010) 108-115
- Feuk L<sup>1</sup>, Carson AR, Scherer SW. Structural variation in the human genome. *Nat Rev Genet.* 2006 Feb;7(2):85-97.
- Flemmig TF<sup>1</sup>, Shanahan F, Miyasaki KT Prevalence and severity of periodontal disease in patients with inflammatory bowel disease. *J Clin Periodontol.* 1991 Oct;18(9):690-7.
- Folwaczny, M. Aspekte der Genetik in der Pathogenese der Parodontitis. *Parodontologie* 2012, 23 (1), 65-81
- Folwaczny M<sup>1</sup>, Glas J, Török HP, Mauermann D, Folwaczny C. The 3020insC mutation of the NOD2/CARD15 gene in patients with periodontal disease. *Eur J Oral Sci.* 2004 Aug;112(4):316-9.
- Folwaczny M<sup>1</sup>, Glas J, Török HP, Limbersky O, Folwaczny C. Toll-like receptor (TLR) 2 and 4 mutations in periodontal disease *Clin Exp Immunol.* 2004 Feb;135(2):330-5.

- Fonseca JE, Santos MJ, Canhao H, Choy E 2009, Interleukin- 6 as key player in systemic inflammation and joint destruction. *Autoimmun Rev* 8, 538-542
- Ford Pauline J., Gamonal Jorge, Seymour Gregory J. 2010 Immunological differences and similarities between chronic periodontitis and aggressive periodontitis, *Periodontology* 2000, Vol. 53, 2010, 111-123
- Franke A1, McGovern DP, Barrett JC, Wang K, Radford-Smith GL, Ahmad T, Lees CW, Balschun T, Lee J, Roberts R, Anderson CA, Bis JC, Bumpstead S, Ellinghaus D, Festen EM, Georges M, Green T, Haritunians T, Jostins L, Latiano A, Mathew CG, Montgomery GW, Prescott NJ, Raychaudhuri S, Rotter JI, Schumm P, Sharma Y, Simms LA, Taylor KD, Whiteman D, Wijmenga C, Baldassano RN, Barclay M, Bayless TM, Brand S, Büning C, Cohen A, Colombel JF, Cottone M, Stronati L, Denson T, De Vos M, D'Inca R, Dubinsky M, Edwards C, Florin T, Franchimont D, Gearry R, Glas J, Van Gossum A, Guthery SL, Halfvarson J, Verspaget HW, Hugot JP, Karban A, Laukens D, Lawrance I, Lemann M, Levine A, Libioulle C, Louis E, Mowat C, Newman W, Panés J, Phillips A, Proctor DD, Regueiro M, Russell R, Rutgeerts P, Sanderson J, Sans M, Seibold F, Steinhardt AH, Stokkers PC, Torkvist L, Kullak-Ublick G, Wilson D, Walters T, Targan SR, Brant SR, Rioux JD, D'Amato M, Weersma RK, Kugathasan S, Griffiths AM, Mansfield JC, Vermeire S, Duerr RH, Silverberg MS, Satsangi J, Schreiber S, Cho JH, Annese V, Hakonarson H, Daly MJ, Parkes M. Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nat Genet.* 2010 Dec;42(12):1118-25.
- Fraser DA, Loos BG, Boman U, van Winkelhoff AJ, van der Velden U, Schenck K, Dembic Z, Polymorphisms in an interferon-gamma receptor-1 gene marker and susceptibility to periodontitis. *Acta Odontol Scand* 2003 Oct; 61 (5):297-302.
- Gaffen SL1, Hajishengallis G. A new inflammatory cytokine on the block: re-thinking periodontal disease and the Th1/Th2 paradigm in the context of Th17 cells and IL-17. *J Dent Res.* 2008 Sep;87(9):817-28.
- Garlet GP1. Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *Dent Res.* 2010 Dec;89(12):1349-63.

- Gemmell E<sup>1</sup>, Marshall RI, Seymour GJ. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontol* 2000. 1997 Jun;14:112-43.
- Gemmell E<sup>1</sup>, Yamazaki K, Seymour GJ. Destructive periodontitis lesions are determined by the nature of the lymphocytic response. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002;13(1):17-34.
- Ghoreschi K1, Laurence A, O'Shea JJ. Janus kinases in immune cell signaling. *Immunol Rev*. 2009 Mar;228(1):273-87
- Girardin Stephen E., Boneca Ivo G., Viala Jerome et al. 2003, Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *The Journal of Biological Chemistry* Vol 278 No11 8869-8872
- Graves D 2008, Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *J Periodontol* 79 (8 Suppl) 1585-1591
- Graves DT1, Jiang Y, Genco C. Periodontal disease: bacterial virulence factors, host response and impact on systemic health. *Curr Opin Infect Dis*. 2000 Jun;13(3):227-232.
- Graves DT<sup>1</sup>, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol*. 2003 Mar;74(3):391-401.
- Graw J.: Genetik, Springer, 2010
- Griffin TJ<sup>1</sup>, Smith LM. Single-nucleotide polymorphism analysis by MALDI-TOF mass spectrometry. *Trends Biotechnol*. 2000 Feb;18(2):77-84.
- Grössner-Schreiber B1, Fetter T, Hedderich J, Kocher T, Schreiber S, Jepsen S. Prevalence of dental caries and periodontal disease in patients with inflammatory bowel disease: a case-control study. *J Clin Periodontol*. 2006 Jul;33(7):478-84.
- Gruber Reinhard 2010, Cell biology of osteoimmunology, Springer Verlag 2010 Wien  
Med Wochenschr (2010) 160/17-18: 438-445



- Guermonprez P1, Valladeau J, Zitvogel L, Théry C, Amigorena S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:621-67
- Gursoy UK<sup>1</sup>, He Q<sup>2</sup>, Pussinen P<sup>3</sup>, Huuonen S<sup>4,5</sup>, Könönen E<sup>6,7</sup>. Alveolar bone loss in relation to toll-like receptor 4 and 9 genotypes and *Porphyromonas gingivalis* carriage. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2016 Nov;35(11):1871-1876.
- Gut IG1. DNA analysis by MALDI-TOF mass spectrometry. *Hum Mutat.* 2004 May;23(5):437-41.
- Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000* 1994, 5, 78-111.
- Hajishengallis G1. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. *Trends Immunol.* 2014 Jan;35(1):3-11
- Hajishengallis G<sup>1</sup>, Moutsopoulos NM. Etiology of leukocyte adhesion deficiency-associated periodontitis revisited: not a raging infection but a raging inflammatory response. *Expert Rev Clin Immunol.* 2014 Aug;10(8):973-5
- Hajishengallis G<sup>1</sup>, Maekawa T, Abe T, Hajishengallis E, Lambris JD. Complement Involvement in Periodontitis: Molecular Mechanisms and Rational Therapeutic Approaches. *Adv Exp Med Biol.* 2015;865:57-74.
- Hamp, S.E., S. Nyman, and J. Lindhe, Periodontal treatment of multirooted teeth. Results after 5 years. *J Clin Periodontol* 1975, 2 (3), p. 126-35
- Han MX1, Ding C2, Kyung HM3. Genetic polymorphisms in pattern recognition receptors and risk of periodontitis: Evidence based on 12,793 subjects. *Hum Immunol.* 2015 Jul;76(7):496-504
- Happel KI<sup>1</sup>, Zheng M, Young E, Quinton LJ, Lockhart E, Ramsay AJ, Shellito JE, Schurr JR, Bagby GJ, Nelson S, Kolls JK. Cutting edge: roles of Toll-like receptor 4 and IL-23 in IL-17 expression in response to *Klebsiella pneumoniae* infection. *J Immunol.* 2003 May 1;170(9):4432-6.
- Hardy J1, Singleton A. Genomewide association studies and human disease. *N Engl J Med.* 2009 Apr 23;360(17):1759-68

- Härtel C1, Hartz A, Pagel J, Rupp J, Stein A, Kribs A, Müller A, Haase R, Gille C, Böttger R, Kittel J, Jensen R, Wieg C, Herting E, Göpel W; German Neonatal Network. NOD2 Loss-of-Function Mutations and Risks of Necrotizing Enterocolitis or Focal Intestinal Perforation in Very Low-birth-weight Infants. *Inflamm Bowel Dis*. 2016 Feb;22(2):249-56.
- van Heel DA1, Ghosh S, Butler M, Hunt KA, Lundberg AM, Ahmad T, McGovern DP, Onnie C, Negoro K, Goldthorpe S, Foxwell BM, Mathew CG, Forbes A, Jewell DP, Playford RJ. Muramyl dipeptide and toll-like receptor sensitivity in NOD2-associated Crohn's disease. *Lancet*. 2005 May 21-27;365(9473):1794-6
- Hellwig E., Klimek J., Attin T., Einführung in die Zahnerhaltung , 4. Auflage, 2006 Urban&Fischer
- Henderson Brian, Ward John M., Ready Derren 2010, *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans: a triple A\* periodontopathogen?* *Periodontology* 2000, Vol. 54, 2010, 78-105
- Hickey GL<sup>1</sup>, Grant SW<sup>2</sup>, Dunning J<sup>3</sup>, Siepe M<sup>4</sup>. Statistical primer: sample size and power calculations-why, when and how? *Eur J Cardiothorac Surg*. 2018 Jul 1;54(1):4-9.
- Hirschhorn JN<sup>1</sup>, Lohmueller K, Byrne E, Hirschhorn K. A comprehensive review of genetic association studies. *Genet Med*. 2002 Mar-Apr;4(2):45-61.
- Hirschhorn JN1, Daly MJ. Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. *Nat Rev Genet*. 2005 Feb;6(2):95-108.
- Hodge SE 1993, Linkage Analysis versus association analysis: distinguishing between two models that explain disease-marker associations. *Am J Hum Genet* 53:367-384
- Hodge SE 1994, What association analysis can and cannot tell us about the genetics of complex disease. *Am J Med Genet* 54: 318-323.
- Hodge P., Michalowicz B.: Genetic predisposition to periodontitis in children and young adults, 2001, *Periodontology* 2000, Vol.26, 113-134

- Hopcraft Matthew S., Morgan Michael V., Statur Julie G., Wright F.A. Clive, Darby Ivan B., Oral hygiene and periodontal disease in Victorian nursing homes. Gerodontology 2010,doi:10.1111/j.1741-2358.2010.00448.x
- Horn Florian, Lindenmeier Gerd, Moc Isabelle, Berghold Silke, Schneider Nadine, Münster Birgit, Biochemie des Menschen Thieme Verlag 2. Auflage 2003
- Hosokawa I1, Hosokawa Y, Ozaki K, Yumoto H, Nakae H, Matsuo T. Proinflammatory effects of muramyl dipeptide on human gingival fibroblasts. J Periodontal Res. 2010 Apr;45(2):193-9.
- Huang QY1, Recker RR, Deng HW. Searching for osteoporosis genes in the post-genome era: progress and challenges Osteoporos Int. 2003 Sep;14(9):701-15
- Huang JS1, Lee YH, Chuang LY, Guh JY, Hwang JY. Cinnamaldehyde and nitric oxide attenuate advanced glycation end products-induced the Jak/STAT signaling in human renal tubular cells. J Cell Biochem. 2015 Jun;116(6):1028-38.
- Hugot, J.-P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cezard, J.-P., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O'Morain, C. A., Gassull, M., Binder, V., Finkel, Y., and 8 others. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. Nature 411: 599-603, 2001.
- Illig Thomas, Vollmert Caren, Gohlke Henning, Klopp Normann 2004, Hochdurchsatz Genotypisierung mit MALDI TOF MS, BIOSpektrum 5/04 10.Jahrgang 1-3 ([http://biospektrum.de/blatt/d\\_bs\\_pdf&\\_id=934387](http://biospektrum.de/blatt/d_bs_pdf&_id=934387))
- Imamura T<sup>1</sup>. The role of gingipains in the pathogenesis of periodontal disease. J Periodontol. 2003 Jan;74(1):111-8.
- Indriolo A, Greco S, Ravelli P, Fagioli S. What we can learn about biofilm/hast interactions from the study of inflammatory bowel disease. J Clin Periodontol 2011, 38 (Suppl. 11) 36-43
- Inohara N1, Ogura Y, Chen FF, Muto A, Nuñez G. Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides. J Biol Chem. 2001 Jan 26;276(4):2551-4.

- Inohara N<sup>1</sup>, Ogura Y, Fontalba A, Gutierrez O, Pons F, Crespo J, Fukase K, Inamura S, Kusumoto S, Hashimoto M, Foster SJ, Moran AP, Fernandez-Luna JL, Nuñez G. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J Biol Chem*. 2003 Feb 21;278(8):5509-12.
- Ishihara Kazuyuki 2010, Virulence factors of *Treponema denticola*, *Periodontology* 2000, Vol. 54, 2010, 117-135
- Johannsen A, Susin C, Gustafsson A. Smoking and inflammation: evidence for a synergistic role in chronic disease. *Periodontol* 2000. 2014 Feb;64(1):111-26.
- Johnson GK<sup>1</sup>, Hill M. Cigarette smoking and the periodontal patient. *J Periodontol*. 2004 Feb;75(2):196-209
- Juran BD, Lazaridis KN 2007, Applying genomics to the study of complex disease. *Semin Liver Dis* 27: 3-12
- Juyal G<sup>1</sup>, Prasad P, Senapati S, Midha V, Sood A, Amre D, Juyal RC, BK T. An investigation of genome-wide studies reported susceptibility loci for ulcerative colitis shows limited replication in north Indians. *PLoS One*. 2011 Jan 31;6(1):e16565
- Karasneh JA<sup>1</sup>, Al Habashneh RA<sup>2</sup>, Marzouka NA<sup>3</sup>, Thornhill MH<sup>4</sup>. Effect of cigarette smoking on subgingival bacteria in healthy subjects and patients with chronic periodontitis. *BMC Oral Health*. 2017 Mar 21;17(1):64
- Kaufmann et al. 2014, Basiswissen Immunologie, Springer Verlag
- Kmieć Z<sup>1</sup>. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 1998;46(3):143-55.
- Kinane DF<sup>1</sup>, Chestnutt IG. Relationship of diabetes to periodontitis. *Curr Opin Periodontol*. 1997;4:29-34.
- Kinane DF<sup>1</sup>, Podmore M, Murray MC, Hodge PJ, Ebersole J. Etiopathogenesis of periodontitis in children and adolescents. *Periodontol* 2000. 2001;26:54-91.
- Kinane DF, Demuth DR, Gorr SU, Hajishengallis GN, Martin MH, Human variability in innate immunity. *Periodontol* 2000 2007;45:14-34

- Kinane DF, Hart TC Genes and Gene Polymorphisms associated with periodontal disease. *Vrit Rev Oral Biol Med* 14 (6)430-449 , 2003
- Kinane D.F, Shiba Hideki, Hart Tomas C. The genetic basis of periodontitis, *Periodontology* 2000, Vol 39, 2005 91-117
- Kinane DF<sup>1</sup>, Bartold PM. Clinical relevance of the host responses of periodontitis. *Periodontol* 2000. 2007;43:278-93
- Kisseleva T<sup>1</sup>, Bhattacharya S, Braunstein J, Schindler CW. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene*. 2002 Feb 20;285(1-2):1-24.
- Klinke Rainer, Pape Hans-Christian, Silbernagl Stefan, *Physiologie*, 5. Auflage, 2005 Thieme Verlag
- Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E, Udagawa N, Takami M, Kotake S, Nakagawa N, Kinosaki M, Yamaguchi K, Shima N, Yasuda H, Morinaga T, Higashio K, Martin TJ, Suda T, Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction, *J Exp Med* 2000,191 275-286
- Kochi S<sup>1</sup>, Yamashiro K<sup>1</sup>, Hongo S<sup>1</sup>, Yamamoto T<sup>2</sup>, Ugawa Y<sup>1</sup>, Shimoe M<sup>1</sup>, Kawamura M<sup>1</sup>, Hirata-Yoshihara C<sup>1</sup>, Ideguchi H<sup>1</sup>, Maeda H<sup>3</sup>, Takashiba S<sup>4</sup>. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* regulates the expression of integrins and reduces cell adhesion via integrin  $\alpha 5$  in human gingival epithelial cells. *Mol Cell Biochem*. 2017 Dec;436(1-2):39-48.
- Kopanakis N, Saiti A, D'Avgerinos E, Masselou K, Simiri M, Mandaraka A, Vasiliadis G, Katergiannakis V. Serum VEGF and bFGF in patients with inflammatory bowel diseases. *Ann Ital Chir*. 2014 May-Jun;85(3):203-6.
- Kornman KS<sup>1</sup>, Crane A, Wang HY, di Giovine FS, Newman MG, Pirk FW, Wilson TG Jr, Higginbottom FL, Duff GW. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 1997 Jan;24(1):72-7.
- Kornman KS, 2001: Patients are not equally susceptible to periodontitis: does this change dental practice and dental curriculum? *J Dent Educ* 2001;65: 777-784

- Kornman K.S.: Mapping the pathogenesis of periodontitis: a new look, 2008, J Periodontol, 79: 1560-1568
- Korte A1, Farlow A1. The advantages and limitations of trait analysis with GWAS: a review. Plant Methods. 2013 Jul 22;9:29.
- Koutouzis T, Haber D, Shaddox L, Aukhil I, Wallet SM 2009, Autoreactivity of serum immunoglobulin to periodontal tissue components: a pilot study. J periodontal 80, 625-633
- Kramer JM<sup>1</sup>, Gaffen SL. Interleukin-17: a new paradigm in inflammation, autoimmunity, and therapy. J Periodontol. 2007 Jun;78(6):1083-93.
- Lachnik J1, Ackermann B, Bohrsen A, Maass S, Diephaus C, Puncken A, Stermann M, Bange FC. Rapid-cycle PCR and fluorimetry for detection of mycobacteria. J Clin Microbiol. 2002 Sep;40(9):3364-73.
- Lalla E1, Papapanou PN. Diabetes mellitus and periodontitis: a tale of two common interrelated diseases. Nat Rev Endocrinol. 2011 Jun 28;7(12):738-48.
- Lam RS<sup>1</sup>, O'Brien-Simpson NM<sup>1</sup>, Hamilton JA<sup>2</sup>, Lenzo JC<sup>1</sup>, Holden JA<sup>1</sup>, Brammar GC<sup>1</sup>, Orth RK<sup>1</sup>, Tan Y<sup>1</sup>, Walsh KA<sup>1</sup>, Fleetwood AJ<sup>2</sup>, Reynolds EC<sup>1</sup>. GM-CSF and uPA are required for Porphyromonas gingivalis-induced alveolar bone loss in a mouse periodontitis model. Immunol Cell Biol. 2015 Sep;93(8):705-15.
- Lehmann K, Hellwig E, Einführung in die zahnärztliche Propädeutik, 9. Auflage, Urban&Fischer, 2002
- Lei Z<sup>1,2,3</sup>, Duan H<sup>4,5</sup>, Zhao T<sup>1,2</sup>, Zhang Y<sup>1,2</sup>, Li G<sup>1,2</sup>, Meng J<sup>1</sup>, Zhang S<sup>6</sup>, Yan W<sup>7,8</sup>. PARK2 inhibits osteosarcoma cell growth through the JAK2/STAT3/VEGF signaling. Cell Death Dis. 2018 Mar 7;9(3):375.
- Li Y, Holzgreve W, Kiefer V, Hahn S. Maldi-tof mass spectrometry compared with real-time PCR for detection of fetal cell-free DNA in maternal plasma. Clin Chem. 2006 Dec;52(12):2311-2.

- Lian S<sup>1</sup>, Lu Y<sup>1</sup>, Cheng Y<sup>1</sup>, Yu T<sup>1</sup>, Xie X<sup>1</sup>, Liang H<sup>1</sup>, Ye Y<sup>2</sup>, Jia L<sup>3</sup>. S-nitrosocaptopril interrupts adhesion of cancer cells to vascular endothelium by suppressing cell adhesion molecules via inhibition of the NF- $\kappa$ B and JAK/STAT signal pathways in endothelial cells. *Eur J Pharmacol*. 2016 Aug 24;791:62-71.
- Lin D1, Li L, Sun Y, Wang W, Wang X, Ye Y, Chen X, Xu Y. IL-17 regulates the expressions of RANKL and OPG in human periodontal ligament cells via TRAF6/TBK1-JNK/NF- $\kappa$ B pathways. *Immunology*. 2015 Mar; 144(3): 472–485.
- Lindhe J, Karring T, Lang N, eds. *Clinical periodontology and implant dentistry*. 4<sup>th</sup> edn. Munksgaard: Blackwell, 2003: 3-48
- Lindhe J, Ranney R, Lamster I, et al.. Consensus report: Chronic periodontitis. *Ann Periodontol* 1999;4:1-6
- Lira-Junior R1, Figueredo CM1. Periodontal and inflammatory bowel diseases: Is there evidence of complex pathogenic interactions? *World J Gastroenterol*. 2016 Sep 21;22(35):7963-72
- Liu H<sup>1</sup>, Luo T<sup>1</sup>, Tan J<sup>2</sup>, Li M<sup>1</sup>, Guo J<sup>3</sup>. Osteoimmunology' Offers New Perspectives for the Treatment of Pathological Bone Loss. *Curr Pharm Des*. 2017 May 11. doi: 10.2174/1381612823666170511124459. [Epub ahead of print]
- Loganathan R1, Nazeer M1, Goda V1, Devaraju P1, Ali M2, Karunakaran P2, Jayaraman M3. Genetic variants of TLR4 and TLR9 are risk factors for chronic *Helicobacter pylori* infection in South Indian Tamils. *Hum Immunol*. 2017 Feb;78(2):216-220.
- Loos BG, John RP, Laine ML. Identification of genetic risk factors for periodontitis and possible mechanism of action. *J Clin Periodontol* 2005 32 (Suppl.6): 159-179.

MacArthur DG<sup>1</sup>, Balasubramanian S, Frankish A, Huang N, Morris J, Walter K, Jostins L, Habegger L, Pickrell JK, Montgomery SB, Albers CA, Zhang ZD, Conrad DF, Lunter G, Zheng H, Ayub Q, DePristo MA, Banks E, Hu M, Handsaker RE, Rosenfeld JA, Fromer M, Jin M, Mu XJ, Khurana E, Ye K, Kay M, Saunders GI, Suner MM, Hunt T, Barnes IH, Amid C, Carvalho-Silva DR, Bignell AH, Snow C, Yngvadottir B, Bumpstead S, Cooper DN, Xue Y, Romero IG; 1000 Genomes Project Consortium, Wang J, Li Y, Gibbs RA, McCarroll SA, Dermitzakis ET, Pritchard JK, Barrett JC, Harrow J, Hurles ME, Gerstein MB, Tyler-Smith C. A systematic survey of loss-of-function variants in human protein-coding genes. *Science*. 2012 Feb 17;335(6070):823-8.

Madeira MF<sup>1</sup>, Queiroz-Junior CM, Cisalpino D, Werneck SM, Kikuchi H, Fujise O, Ryffel B, Silva TA, Teixeira MM, Souza DG. MyD88 is essential for alveolar bone loss induced by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide in mice. *Mol Oral Microbiol*. 2013 Dec;28(6):415-24.

Mahanonda R, Pichyankul S 2007, Toll-like receptors and their role in periodontal health and disease *Periodontol* 2000 43, 41-55

Mahid SS<sup>1</sup>, Minor KS, Soto RE, Hornung CA, Galandiuk S. Smoking and inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Mayo Clin Proc*. 2006 Nov;81(11):1462-71.

Manolio TA<sup>1</sup>. Genomewide association studies and assessment of the risk of disease. *N Engl J Med*. 2010 Jul 8;363(2):166-76

Marsh PD<sup>1</sup>, Bradshaw DJ. Dental plaque as a biofilm. *J Ind Microbiol*. 1995 Sep;15(3):169-75.



- McGovern DP1, Gardet A, Törkvist L, Goyette P, Essers J, Taylor KD, Neale BM, Ong RT, Lagacé C, Li C, Green T, Stevens CR, Beauchamp C, Fleshner PR, Carlson M, D'Amato M, Halfvarson J, Hibberd ML, Lördal M, Padyukov L, Andriulli A, Colombo E, Latiano A, Palmieri O, Bernard EJ, Deslandres C, Hommes DW, de Jong DJ, Stokkers PC, Weersma RK; NIDDK IBD Genetics Consortium, Sharma Y, Silverberg MS, Cho JH, Wu J, Roeder K, Brant SR, Schumm LP, Duerr RH, Dubinsky MC, Glazer NL, Haritunians T, Ippoliti A, Melmed GY, Siscovick DS, Vasiliauskas EA, Targan SR, Annese V, Wijmenga C, Pettersson S, Rotter JI, Xavier RJ, Daly MJ, Rioux JD, Seielstad M. Genome-wide association identifies multiple ulcerative colitis susceptibility loci. *Nat Genet.* 2010 Apr;42(4):332-7.
- McGovern DP1, Butler H, Ahmad T, Paolucci M, van Heel DA, Negoro K, Hysi P, Ragoussis J, Travis SP, Cardon LR, Jewell DP. TUCAN (CARD8) genetic variants and inflammatory bowel disease *Gastroenterology.* 2006 Oct;131(4):1190-6.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Janeway, C. A., Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388: 394-397, 1997.
- Menegat JS<sup>1</sup>, Lira-Junior R<sup>1</sup>, Siqueira MA<sup>2</sup>, Brito F<sup>1</sup>, Carvalho AT<sup>3</sup>, Fischer RG<sup>1</sup>, Figueredo CM<sup>4</sup>. Cytokine expression in gingival and intestinal tissues of patients with periodontitis and inflammatory bowel disease: An exploratory study. *Arch Oral Biol.* 2016 Jun;66:141-6
- Meylan F1, Davidson TS, Kahle E, Kinder M, Acharya K, Jankovic D, Bundoc V, Hodges M, Shevach EM, Keane-Myers A, Wang EC, Siegel RM. The TNF-family receptor DR3 is essential for diverse T cell-mediated inflammatory diseases. *Immunity.* 2008 Jul 18;29(1):79-89
- Meyle J1, Gonzáles JR. Influences of systemic diseases on periodontitis in children and adolescents. *Periodontol 2000.* 2001;26:92-112.
- Michalowicz B.S., Aeppli D.P., Kuba R.K., Bereuter J.E., Conry J.P., Segal N.L., Bouchard T.J. Jr., Pihlstrom B.L.: A twin study of genetic variation in proportional radiographic alveolar bone height, 1991, *J Dent Res*, 70: 1431–1435

- W. Micheelis, R.K., J Krämer.2006. Vierte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMSIV)  
In B. Kassenärztliche Bundesvereinigung (e.d.) vol. IV. Boeken.
- Migone TS1, Zhang J, Luo X, Zhuang L, Chen C, Hu B, Hong JS, Perry JW, Chen SF, Zhou JX, Cho YH, Ullrich S, Kanakaraj P, Carrell J, Boyd E, Olsen HS, Hu G, Pukac L, Liu D, Ni J, Kim S, Gentz R, Feng P, Moore PA, Ruben SM, Wei P. TL1A is a TNF-like ligand for DR3 and TR6/DcR3 and functions as a T cell costimulator. *Immunity*. 2002 Mar;16(3):479-92.
- Mombelli A1, Casagni F, Madianos PN. Can presence or absence of periodontal pathogens distinguish between subjects with chronic and aggressive periodontitis? A systematic review. *J Clin Periodontol*. 2002;29 Suppl 3:10-21; discussion 37-8.
- Mori Y, YoshimuraA, Ukai T et al Immunohistochemical localization of Toll-like receptors 2 and 4 in gingival tissue from patients with periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 2003, 18, 54-58
- Moss ME1, Beck JD, Kaplan BH, Offenbacher S, Weintraub JA, Koch GG, Genco RJ, Machtei EE, Tedesco LA. Exploratory case-control analysis of psychosocial factors and adult periodontitis. *J Periodontol*. 1996 Oct;67(10 Suppl):1060-9
- Murken, Jan, Grimm, Timo, Holinski-Feder, Elke, Zerres, Klaus. Taschenlehrbuch Humangenetik. 8. Auflage Thieme Verlag 2011
- Murray PA<sup>1</sup>. Periodontal diseases in patients infected by human immunodeficiency virus. *Periodontol* 2000. 1994 Oct;6:50-67.
- Murray PJ1. The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. *J Immunol*. 2007 Mar 1;178(5):2623-9.
- Müller, Hans-Peter, Parodontologie, Thieme Verlag 2001
- Nagasawa T,Nitta H, Watabne H, Ishikawa J,1995. Reduced CD8+ peripheral blood lymphocytes in rapidly progressive periodontitis. *Arch Oral Biol* 40, 605-608
- Nakamura Y<sup>1</sup>. DNA variations in human and medical genetics: 25 years of my experience. *J Hum Genet*. 2009 Jan;54(1):1-8

- Nakayama M<sup>1</sup>, Inoue T<sup>1</sup>, Naito M<sup>2</sup>, Nakayama K<sup>2</sup>, Ohara N<sup>3</sup>. Attenuation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway by *Porphyromonas gingivalis* gingipains RgpA, RgpB, and Kgp. *J Biol Chem*. 2015 Feb 20;290(8):5190-202
- Nam NH1. Naturally occurring NF-kappaB inhibitors. *Mini Rev Med Chem*. 2006 Aug;6(8):945-51.
- Nativel B<sup>1</sup>, Couret D<sup>1,2</sup>, Giraud P<sup>1</sup>, Meilhac O<sup>1</sup>, d'Hellencourt CL<sup>1</sup>, Viranaïcken W<sup>3</sup>, Da Silva CR<sup>4</sup>. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharides act exclusively through TLR4 with a resilience between mouse and human. *Sci Rep*. 2017 Nov 17;7(1):15789
- Neubauer H, Cumano A, Muller M, et al., Jak2 deficiency defines an essential development checkpoint in definitive hematopoiesis. *Cell*. 1998;93,397-409.
- Newton-Cheh C1, Hirschhorn JN. Genetic association studies of complex traits: design and analysis issues. *Mutat Res*. 2005 Jun 3;573(1-2):54-69.
- Nichols TC<sup>1</sup>, Fischer TH, Deliargyris EN, Baldwin AS Jr. Role of nuclear factor-kappa B (NF-kappa B) in inflammation, periodontitis, and atherogenesis. *Ann Periodontol*. 2001 Dec;6(1):20-9.
- Nishihara T, Koseki T 2004, Microbial etiology of periodontitis. *Periodontol 2000* 2004 36 14-26
- Nunn ME<sup>1</sup>. Understanding the etiology of periodontitis: an overview of periodontal risk factors. *Periodontol 2000*. 2003;32:11-23.
- Nussbaum G1, Shapira L. How has neutrophil research improved our understanding of periodontal pathogenesis? *J Clin Periodontol*. 2011 Mar;38 Suppl 11:49-59
- Offenbacher S1, Divaris K2, Barros SP3, Moss KL4, Marchesan JT3, Morelli T3, Zhang S3, Kim S3, Sun L3, Beck JD4, Laudes M5, Munz M6, Schaefer AS7, North KE8 Genome-wide association study of biologically-informed periodontal complex traits offers novel insights into the genetic basis of periodontal disease. *Hum Mol Genet*. 2016 March 8, 1-17

- Ogawa T<sup>1</sup>, Asai Y, Makimura Y, Tamai R. Chemical structure and immunobiological activity of *Porphyromonas gingivalis* lipid A. *Front Biosci.* 2007 May 1;12:3795-812.
- Ogura, Y., Inohara, N., Benito, A., Chen, F. F., Yamaoka, S., Nunez, G. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappa-B. *J. Biol. Chem.* 276: 4812-4818, 2001.
- Ogura Y<sup>1</sup>, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nuñez G, Cho JH. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature.* 2001 May 31;411(6837):603-6.
- Oh HM<sup>1</sup>, Lee HJ, Seo GS, Choi EY, Kweon SH, Chun CH, Han WC, Lee KM, Lee MS, Choi SC, Jun CD. Induction and localization of NOD2 protein in human endothelial cells. *Cell Immunol.* 2005 Sep;237(1):37-44.
- Ohashi J<sup>1</sup>, Tokunaga K. The power of genome-wide association studies of complex disease genes: statistical limitations of indirect approaches using SNP markers. *J Hum Genet.* 2001;46(8):478-82.
- Ohlrich EJ<sup>1</sup>, Cullinan MP, Seymour GJ. The immunopathogenesis of periodontal disease. *Aust Dent J.* 2009 Sep;54 Suppl 1:S2-10
- Ohyama H<sup>1</sup>, Kato-Kogoe N, Kuhara A, Nishimura F, Nakasho K, Yamanegi K, Yamada N, Hata M, Yamane J, Terada N. The involvement of IL-23 and the Th17 pathway in periodontitis. *J Dent Res.* 2009 Jul;88(7):633-8
- Okugawa T<sup>1</sup>, Kaneko T, Yoshimura A, Silverman N, Hara Y. NOD1 and NOD2 mediate sensing of periodontal pathogens. *J Dent Res.* 2010 Feb;89(2):186-91.
- Oliver-Bell J<sup>1</sup>, Butcher JP, Malcolm J, MacLeod MK, Adrados Planell A, Campbell L, Nibbs RJ, Garside P, McInnes IB, Culshaw S. Periodontitis in the absence of B cells and specific anti-bacterial antibody. *Mol Oral Microbiol.* 2015 Apr;30(2):160-9
- O'Neill LA<sup>1</sup>, Golenbock D, Bowie AG. The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2013 Jun;13(6):453-60

- Page Roy C., Offenbacher Steven, Schroeder Hubert E., Seymour Gregory J., Kornman Kenneth S. 1997: Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontology* 2000, Vol. 14, 1997, 216-248
- Page RC, Schroeder HE. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab Invest* 1976;34;235-249.
- Page RC1. Milestones in periodontal research and the remaining critical issues. *J Periodontal Res.* 1999 Oct;34(7):331-9.
- Pandey UB<sup>1</sup>, Nichols CD. Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. *Pharmacol Rev.* 2011 Jun;63(2):411-36.
- Papadakis KA<sup>1</sup>, Prehn JL, Landers C, Han Q, Luo X, Cha SC, Wei P, Targan SR. TL1A synergizes with IL-12 and IL-18 to enhance IFN-gamma production in human T cells and NK cells. *Immunol.* 2004 Jun 1;172(11):7002-7.
- Papageorgiou SN<sup>1</sup>, Hagner M<sup>2</sup>, Nogueira AV<sup>3</sup>, Franke A<sup>4</sup>, Jäger A<sup>5</sup>, Deschner J<sup>6</sup>. Inflammatory bowel disease and oral health: systematic review and a meta-analysis. *J Clin Periodontol.* 2017 Apr;44(4):382-393.
- Pappu BP<sup>1</sup>, Borodovsky A, Zheng TS, Yang X, Wu P, Dong X, Weng S, Browning B, Scott ML, Ma L, Su L, Tian Q, Schneider P, Flavell RA, Dong C, Burkly LC. TL1A-DR3 interaction regulates Th17 cell function and Th17-mediated autoimmune disease. *J Exp Med.* 2008 May 12;205(5):1049-62
- Pardanan Animesh, Fridley Brooke L., Laso Terra L., Gilliland D. Gary, Tefferi Ayalew 2008. Host genetic variation contributes to phenotypic diversity in myeloproliferative disorders. *Blood* 2008;V111, NB5, 2785-2789
- Parganas E, Wang D, Stravopodis D et al.. Jak2 is essential for signalling through a variety of cytokine receptors, *Cell* 1998;93,385-395
- Parkes M1, Cortes A, van Heel DA, Brown MA. Genetic insights into common pathways and complex relationships among immune-mediated diseases. *Nat Rev Genet.* 2013 Sep;14(9):661-73

- Picornell, Y., Mei, L., Taylor, K., Yang, H., Targan, S. R., Rotter, J. I. TNFSF15 is an ethnic-specific IBD gene. *Inflamm. Bowel Dis.* 13: 1333-1338, 2007
- Prager M1, Büttner J, Haas V, Baumgart DC, Sturm A, Zeitz M, Büning C. The JAK2 variant rs10758669 in Crohn's disease: altering the intestinal barrier as one mechanism of action. *Int J Colorectal Dis.* 2012 May;27(5):565-73
- Prates TP1, Taira TM2, Holanda MC2, Bignardi LA1, Salvador SL3, Zamboni DS4, Cunha FQ5, Fukada SY6. NOD2 contributes to *Porphyromonas gingivalis*-induced bone resorption. *J Dent Res.* 2014 Nov;93(11):1155-62
- Ragoussis J1, Elvidge GP, Kaur K, Colella S. Matrix-assisted laser desorption/ionisation, time-of-flight mass spectrometry in genomics research. *PLoS Genet.* 2006 Jul;2(7):e100.
- Rateitschak, K.H. 2003 *Farbatlant der Zahnmedizin*, Bd.1, vol. 3. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York
- Redon R1, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, Fiegler H, Shapero MH, Carson AR, Chen W, Cho EK, Dallaire S, Freeman JL, González JR, Gratacòs M, Huang J, Kalaitzopoulos D, Komura D, MacDonald JR, Marshall CR, Mei R, Montgomery L, Nishimura K, Okamura K, Shen F, Somerville MJ, Tchinda J, Valsesia A, Woodwark C, Yang F, Zhang J, Zerjal T, Zhang J, Armengol L, Conrad DF, Estivill X, Tyler-Smith C, Carter NP, Aburatani H, Lee C, Jones KW, Scherer SW, Hurles ME. Global variation in copy number in the human genome. *Nature.* 2006 Nov 23;444(7118):444-54.
- Roberts R1, Wells GA, Stewart AF, Dandona S, Chen L. The genome-wide association study--a new era for common polygenic disorders. *J Cardiovasc Transl Res.* 2010 Jun;3(3):173-82.
- Rotimi Charles N., Ph.D, Jorde Lynn b. Ph.D *Ancestry and Disease in the Age of Genomic Medicine.* N ENGL J MED 363;6 Oct 14, 2010 1551-1557.
- Rose BJ1, Kooyman DL1 A Tale of Two Joints: The Role of Matrix Metalloproteases in Cartilage Biology. *Dis Markers.* 2016;2016:4895050

- Rubino SJ<sup>1</sup>, Selvanantham T, Girardin SE, Philpott DJ. Nod-like receptors in the control of intestinal inflammation. *Curr Opin Immunol*. 2012 Aug;24(4):398-404
- Saraiva AM<sup>1</sup>, Alves e Silva MR, Correia Silva Jde F, da Costa JE, Gollob KJ, Dutra WO, Moreira PR. Evaluation of IL17A expression and of IL17A, IL17F and IL23R gene polymorphisms in Brazilian individuals with periodontitis. *Hum Immunol*. 2013 Feb;74(2):207-14
- Sartor RB<sup>1</sup>. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2008 Feb;134(2):577-94
- Sato K<sup>1</sup>, Suematsu A, Okamoto K, Yamaguchi A, Morishita Y, Kadono Y, Tanaka S, Kodama T, Akira S, Iwakura Y, Cua DJ, Takayanagi H. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J Exp Med*. 2006 Nov 27;203(12):2673-82.
- Schaefer AS<sup>1</sup>, Richter GM, Nothnagel M, Manke T, Dommisch H, Jacobs G, Arlt A, Rosenstiel P, Noack B, Groessner-Schreiber B, Jepsen S, Loos BG, Schreiber S. A genome-wide association study identifies GLT6D1 as a susceptibility locus for periodontitis. *Hum Mol Genet*. 2010 Feb 1;19(3):553-62
- Schaeffeler E<sup>1</sup>, Zanger UM, Eichelbaum M, Asante-Poku S, Shin JG, Schwab M. Highly multiplexed genotyping of thiopurine s-methyltransferase variants using MALD-TOF mass spectrometry: reliable genotyping in different ethnic groups. *Clin Chem*. 2008 Oct;54(10):1637-47
- Schenkein Harvey A., 2002: Finding genetic risk factors for periodontal diseases: is he climb worth the view? *Periodontology* 2000, Vol. 30, 2002, 79-90
- Schnitzler F<sup>1</sup>, Friedrich M<sup>2</sup>, Wolf C<sup>3</sup>, Stallhofer J<sup>1</sup>, Angelberger M<sup>1</sup>, Diegelmann J<sup>4</sup>, Olszak T<sup>1</sup>, Tillack C<sup>1</sup>, Beigel F<sup>1</sup>, Göke B<sup>1</sup>, Glas J<sup>5</sup>, Lohse P<sup>6</sup>, Brand S<sup>1</sup>. The NOD2 Single Nucleotide Polymorphism rs72796353 (IVS4+10 A>C) Is a Predictor for Perianal Fistulas in Patients with Crohn's Disease in the Absence of Other NOD2 Mutations. *PLoS One*. 2015 Jul 6;10(7):e0116044. doi: 10.1371/journal.pone.0116044. eCollection 2015.
- Schreiber TH<sup>1</sup>, Podack ER. Immunobiology of TNFSF15 and TNFRSF25. *Immunol Res*. 2013 Dec;57(1-3):3-11

- Schröder NW<sup>1</sup>, Meister D, Wolff V, Christan C, Kaner D, Haban V, Purucker P, Hermann C, Moter A, Göbel UB, Schumann RR. Chronic periodontal disease is associated with single-nucleotide polymorphisms of the human TLR-4 gene. *Genes Immun.* 2005 Aug;6(5):448-51.
- Schwenzer N., Ehrenfeld M. 2000: Zahnärztliche Chirurgie, Band 3, S. 182-185
- Sellers RM<sup>1</sup>, Payne JB<sup>2,3</sup>, Yu F<sup>4</sup>, LeVan TD<sup>5,6</sup>, Walker C<sup>7</sup>, Mikuls TR<sup>5</sup>. TLR4 Asp299Gly polymorphism may be protective against chronic periodontitis. *J Periodontal Res.* 2016 Apr;51(2):203-11
- Sen R, Baltimore D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell.* 1986 Dec 26;47(6):921-8.
- Sharma Ashu 2010, Virulence mechanisms of *Tanerella forsythia*, *Periodontology*2000, Vol. 54, 2010, 106-116
- Shiau HJ<sup>1</sup>, Reynolds MA. Sex differences in destructive periodontal disease: exploring the biologic basis. *J Periodontol.* 2010 Nov;81(11):1505-17.
- Shih DQ<sup>1</sup>, Kwan LY, Chavez V, Cohavy O, Gonsky R, Chang EY, Chang C, Elson CO, Targan SR. Microbial induction of inflammatory bowel disease associated gene TL1A (TNFSF15) in antigen presenting cells. *Eur J Immunol.* 2009 Nov;39(11):3239-50
- Siakavellas SI<sup>1</sup>, Bamias G. Tumor Necrosis Factor-like Cytokine TL1A and Its Receptors DR3 and DcR3: Important New Factors in Mucosal Homeostasis and Inflammation. *Inflamm Bowel Dis.* 2015 Oct;21(10):2441-52
- Sivakumaran S<sup>1</sup>, Agakov F, Theodoratou E, Prendergast JG, Zgaga L, Manolio T, Rudan I, McKeigue P, Wilson JF, Campbell H. Abundant pleiotropy in human complex diseases and traits. *Am J Hum Genet.* 2011 Nov 11;89(5):607-18.
- Slatkin M<sup>1</sup>. Linkage disequilibrium--understanding the evolutionary past and mapping the medical future. *Nat Rev Genet.* 2008 Jun;9(6):477-85
- Socransky SS<sup>1</sup>, Haffajee AD. Microbial mechanisms in the pathogenesis of destructive periodontal diseases: a critical assessment. *J Periodontal Res.* 1991 May;26(3 Pt 2):195-212.



- Socransky SS<sup>1</sup>, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998 Feb;25(2):134-44.
- Sodek J<sup>1</sup>, Batista Da Silva AP, Zohar R. Osteopontin and mucosal protection. *J Dent Res*. 2006 May;85(5):404-15.
- Solé X<sup>1</sup>, Guinó E, Valls J, Iniesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics*. 2006 Aug 1;22(15):1928-9.
- Soskolne WA<sup>1</sup>. Epidemiological and clinical aspects of periodontal diseases in diabetics. *Ann Periodontol*. 1998 Jul;3(1):3-12.
- Souto GR<sup>1</sup>, Queiroz-Junior CM<sup>1</sup>, de Abreu MH<sup>2</sup>, Costa FO<sup>1</sup>, Mesquita RA<sup>1</sup>. Pro-inflammatory, Th1, Th2, Th17 cytokines and dendritic cells: a cross-sectional study in chronic periodontitis. *PLoS One*. 2014 Mar 26;9(3)
- de Souza HS<sup>1</sup>, Fiocchi C<sup>2</sup>. Immunopathogenesis of IBD: current state of the art. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2016 Jan;13(1):13-27.
- Souza JA<sup>1</sup>, Medeiros MC<sup>1</sup>, Rocha FR<sup>1</sup>, de Aquino SG<sup>1</sup>, Ávila-Campos MJ<sup>2</sup>, Spolidorio LC<sup>3</sup>, Zamboni DS<sup>4</sup>, Graves DT<sup>5</sup>, Rossa C Junior<sup>6</sup>. Role of NOD2 and RIP2 in host-microbe interactions with Gram-negative bacteria: insights from the periodontal disease model. *Innate Immun*. 2016 Sep 7. pii: 1753425916666652. [Epub ahead of print]
- Stabholz Ayala, Soskolne Aubrey W., Shapira Lior 2010, Genetic and environmental risk factors for chronic periodontitis and aggressive periodontitis. *Periodontology* 2000, Vol 53, 2010, 138-153
- Steinman L<sup>1</sup>. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med*. 2007 Feb;13(2):139-45.
- Stephens M<sup>1</sup>, Smith NJ, Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet*. 2001 Apr;68(4):978-89.
- Strober W<sup>1</sup>, Murray PJ, Kitani A, Watanabe T. Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat Rev Immunol*. 2006 Jan;6(1):9-20.

- Sugita N1, Iwanaga R, Kobayashi T, Yoshie H. Association of the FcγRIIB-nt645+25A/G polymorphism with the expression level of the FcγRIIb receptor, the antibody response to *Porphyromonas gingivalis* and the severity of periodontitis. *J Periodontal Res*. 2012 Feb;47(1):105-13.
- Suerbaum, Kaufmann et al., *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie* Springer Verlag 2012, 7.Auflage
- Sun Y1,2,3, Irwanto A4, Toyo-Oka L5, Hong M6, Liu H1,2,3, Andiappan AK7, Choi H6, Hitomi Y5, Yu G1,2,3, Yu Y1,2,3, Bao F1,2,3, Wang C1,2,3, Fu X1,2,3, Yue Z1,2,3, Wang H1,2,3, Zhang H1,2,3, Kawashima M5, Kojima K8, Nagasaki M8, Nakamura M9, Yang SK10, Ye BD10, Denise Y4,11, Rotzschke O7, Song K6, Tokunaga K5, Zhang F1,2,3,12,13, Liu J4. Fine-mapping analysis revealed complex pleiotropic effect and tissue-specific regulatory mechanism of TNFSF15 in primary biliary cholangitis, Crohn's disease and leprosy. *Sci Rep*. 2016 Aug 10;6:31429. doi: 10.1038/srep31429.
- Tabeta Koichi, Shimada Yasuko, Tai Hideaki, Ishihara Yuichi, Noguchi Toshihide, Soga Yoshihiko, Takashiba Shogo, Suzuki Genki, Terukazu Kobayashi, Akira Oka, Tetsuo Kobayasshi, Kazuhisa Yamazaki, Hidetoshi Inoko and Hiromasa Yoshi. Assesment of Chromosome 19 for Genetic Assiciation in Severe Chronic Periodontitis. *J Periodontol* April 2009 Vol 80, Nr 4 663-617
- Tabeta Koichi, Shimada Yasuko, Tai Hideaki, Ishihara Yuichi, Noguchi Toshihide, Soga Yoshihiko, Takashiba Shogo, Suzuki Genki, Kobayashi
- Teramachi J1, Inagaki Y2, Shinohara H3,2, Okamura H3, Yang D3, Ochiai K4, Baba R5, Morimoto H5, Nagata T2, Haneji T3. PKR regulates LPS-induced osteoclast formation and bone destruction in vitro and in vivo. *Oral Dis*. 2016 Oct 8. doi: 10.1111/odi.12592. [Epub ahead of print]
- Tabor HK1, Risch NJ, Myers RM. Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. *Nat Rev Genet*. 2002 May;3(5):391-7
- Taylor John J. 2010, Cytokine regulation of immune responses to *Porphyromonas gingivalis*, *Periodontology* 2000, Vol. 54, 2010, 160-194

Taylor JJ<sup>1</sup>, Preshaw PM, Lalla E. A review of the evidence for pathogenic mechanisms that may link periodontitis and diabetes. *J Clin Periodontol*. 2013 Apr;40 Suppl 14:S113-34.

Tervonen T<sup>1</sup>, Oliver RC. Long-term control of diabetes mellitus and periodontitis. *J Clin Periodontol* 1993 Jul;20(6):431-5.

The UK IBD Genetics Consortium and The Wellcome Trust Case Control Consortium 2,2009: Genome-wide association study of ulcerative colitis identifies three new susceptibility loci, including the HNF4A region, *Nat Genet*. 2009, December, 41(12): 1330-1334)

Thiébaud R<sup>1</sup>, Kotti S, Jung C, Merlin F, Colombel JF, Lemann M, Almer S, Tysk C, O'Morain M, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Pascoe L, Hugot JP. TNFSF15 polymorphisms are associated with susceptibility to inflammatory bowel disease in a new European cohort. *Am J Gastroenterol*. 2009 Feb;104(2):384-91.

Tsai C.C, Hong Y.C, Chen C. C, Wu Y. M. 1998, Measurement of prostaglandin E2 and leukotrien B4 in the gingival cervical fluid. *J Dent* 1998 26, 97-203

Uehara A<sup>1</sup>, Takada H. Synergism between TLRs and NOD1/2 in oral epithelial cells. *J Dent Res*. 2008 Jul;87(7):682-6.

Unlü F<sup>1</sup>, Güneri PG, Hekimgil M, Yeşilbek B, Boyacioğlu H. Expression of vascular endothelial growth factor in human periodontal tissues: comparison of healthy and diabetic patients. *J Periodontol*. 2003 Feb;74(2):181-7.

Urnowey S<sup>1</sup>, Ansai T, Bitko V, Nakayama K, Takehara T, Barik S. Temporal activation of anti- and pro-apoptotic factors in human gingival fibroblasts infected with the periodontal pathogen, *Porphyromonas gingivalis*: potential role of bacterial proteases in host signalling. *BMC Microbiol*. 2006 Mar 8;6:26.

Vandenbroucke JP<sup>1</sup>, von Elm E, Altman DG, Gøtzsche PC, Mulrow CD, Pocock SJ, Poole C, Schlesselman JJ, Egger M; STROBE Initiative. Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE): explanation and elaboration. *Epidemiology*. 2007 Nov;18(6):805-35.

- Vaithilingam RD1, Safii SH, Baharuddin NA, Ng CC, Cheong SC, Bartold PM, Schaefer AS, Loos BG. Moving into a new era of periodontal genetic studies: relevance of large case-control samples using severe phenotypes for genome-wide association studies. *J Periodontal Res.* 2014 Dec;49(6):683-95.
- W. Micheelis, R.K., J Krämer.2006. Vierte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMSIV) In B. Kassenärztliche Bundesvereinigung (e.d.) vol. IV. Boeken.
- Wagner J1, Skinner NA, Catto-Smith AG, Cameron DJ, Michalski WP, Visvanathan K, Kirkwood CD.: TLR4, IL10RA, and NOD2 mutation in paediatric Crohn's disease patients: an association with *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis and TLR4 and IL10RA expression., *Med Microbiol Immunol.* 2013 Aug;202(4):267-76.
- Wang WYS, Barratt BJ, Clayton DG, Todd JA. Genome-wide association studies: theoretical and practical concerns. *Nat Rev* 2005;6:109-118
- Waterman M1, Xu W, Stempak JM, Milgrom R, Bernstein CN, Griffiths AM, Greenberg GR, Steinhart AH, Silverberg MS. Distinct and overlapping genetic loci in Crohn's disease and ulcerative colitis: correlations with pathogenesis. *Inflamm Bowel Dis.* 2011 Sep;17(9):1936-42.
- Weatherspoon DJ, Borrell LN, Johnson CW, Mujahid MS, Neighbors HW, Adar SD. Racial and Ethnic Differences in Self-Reported Periodontal Disease in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Oral Health Prev Dent.* 2016;14(3):249-57
- Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature.* 2007 Jun 7;447(7145):661-78.
- Werner M<sup>1</sup>, Sych M, Herbon N, Illig T, König IR, Wjst M. Large-scale determination of SNP allele frequencies in DNA pools using MALDI-TOF mass spectrometry. *Hum Mutat.* 2002 Jul;20(1):57-64.
- Wilson M1, Reddi K, Henderson B. Cytokine-inducing components of periodontopathogenic bacteria. *J Periodontal Res.* 1996 Aug;31(6):393-407.

- Wu Y<sup>1</sup>, Zhu L, Wei H, Peng B. Regulation of matrix metalloproteinases, tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1, and extracellular metalloproteinase inducer by interleukin-17 in human periodontal ligament fibroblasts. *J Endod.* 2013 Jan;39(1):62-7
- Xavier RJ, Huett A, Rioux JD 2008, Autophagy as an important process in gut homeostasis and Crohn's disease pathogenesis. *Gut* 57 (6):717-720.
- Yamazaki, K., McGovern, D., Ragoussis, J., Paolucci, M., Butler, H., Jewell, D., Cardon, L., Takazoe, M., Tanaka, T., Ichimori, T., Saito, S., Sekine, A., Iida, A., Takahashi, A., Tsunoda, T., Lathrop, M., Nakamura, Y. Single nucleotide polymorphisms in TNFSF15 confer susceptibility to Crohn's disease. *Hum. Molec. Genet.* 14: 3499-3506, 2005
- Yoshie H, Kobayashi T, Tai H, Galicia JC, 2007: The role of genetic polymorphisms in periodontitis. *Periodontol* 2000, 2007, 43: 102-132
- Yuan H1, Zelkha S, Burkatovskaya M, Gupte R, Leeman SE, Amar S. Pivotal role of NOD2 in inflammatory processes affecting atherosclerosis and periodontal bone loss. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Dec 24;110(52):E5059-68.
- Zee, K-Y, Smoking and periodontal disease, *Australian Dental Journal* 2009, 54, 44-50
- Zhang FR1, Huang W, Chen SM, Sun LD, Liu H, Li Y, Cui Y, Yan XX, Yang HT, Yang RD, Chu TS, Zhang C, Zhang L, Han JW, Yu GQ, Quan C, Yu YX, Zhang Z, Shi BQ, Zhang LH, Cheng H, Wang CY, Lin Y, Zheng HF, Fu XA, Zuo XB, Wang Q, Long H, Sun YP, Cheng YL, Tian HQ, Zhou FS, Liu HX, Lu WS, He SM, Du WL, Shen M, Jin QY, Wang Y, Low HQ, Erwin T, Yang NH, Li JY, Zhao X, Jiao YL, Mao LG, Yin G, Jiang ZX, Wang XD, Yu JP, Hu ZH, Gong CH, Liu YQ, Liu RY, Wang DM, Wei D, Liu JX, Cao WK, Cao HZ, Li YP, Yan WG, Wei SY, Wang KJ, Hibberd ML, Yang S, Zhang XJ, Liu JJ. Genomewide association study of leprosy. *N Engl J Med.* 2009 Dec 31;361(27):2609-18
- Zhang J1, Wang X, Fahmi H, Wojcik S, Fikes J, Yu Y, Wu J, Luo H. Role of TL1A in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Immunol.* 2009 Oct 15;183(8):5350-7

Zhang JX<sup>1</sup>, Song J, Wang J, Dong WG. JAK2 rs10758669 polymorphisms and susceptibility to ulcerative colitis and Crohn's disease: a meta-analysis. *Inflammation*. 2014 Jun;37(3):793-800

Zheng Z<sup>1</sup>, Chen H, Zhao H, Liu K, Luo D, Chen Y, Chen Y, Yang X, Gu Q, Xu X. Inhibition of JAK2/STAT3-mediated VEGF upregulation under high glucose conditions by PEDF through a mitochondrial ROS pathway in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010 Jan;51(1):64-71

## **10 Danksagung**

In erster Linie danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. Matthias Folwaczny für die freundliche Überlassung des Dissertationsthemas sowie für die engagierte Unterstützung und fachliche Betreuung. Herzlich danke ich Frau Brigitte Hackl und Frau Andrea Heigl für die Einweisung in die Arbeit im Zellkulturlabor sowie für die stetige und positive Motivation. Ich bin auch Frau Dr. Julia Dieglmann für ihre Hilfe sehr dankbar.

Vielen Dank an meine Kolleginnen Frau Dr. Laura Westmar und Frau Dr. Christina Diegritz für die Unterstützung und gute Zusammenarbeit. Herzlichen Dank an meine Freunde und an meinen Lebensgefährten, Thomas Haas, für die Unterstützung und Geduld. Danken möchte ich vor allem Herrn Jacob Rebay von Ehrenwiesen für die Hilfe bei der graphischen Darstellung.

Besonderer Dank gilt meinem Bruder, Herrn Michael Buhl und Frau Christina Rebay von Ehrenwiesen für die Durchsicht der Arbeit sowie meinen Eltern, die mir das Studium der Zahnheilkunde ermöglicht haben und mir stets liebevoll und geduldig zur Seite stehen.

## **11 Lebenslauf**